



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

## RELACIÓ DE LA PARAOXONASA PON1 AMB L'ESTRÈS OXIDATIU EN L'AFECTACIÓ MICROVASCULAR EN RETINOPATIA DIABÈTICA

Patricia Pujol Gomis

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

**WARNING.** Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



## **Relació de la paraoxonasa PON1 amb l'estrès oxidatiu en l'afectació microvascular en la retinopatia diabètica**

---

PATRÍCIA PUJOL GOMIS



**TESI DOCTORAL  
2018**

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
RELACIÓ DE LA PARAOXONASA PON1 AMB L'ESTRÈS OXIDATIU EN L'AFECTACIÓ MICROVASCULAR  
EN RETINOPATIA DIABÈTICA  
Patricia Pujol Gomis

# Relació de la paraoxonasa PON 1 amb l'estrès oxidatiu en l'afectació microvascular en la retinopatia diabètica

Patricia Pujol Gomis

Departament de Medicina i Cirurgia

Universitat Rovira i Virgili



UNIVERSITAT  
ROVIRA i VIRGILI

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
RELACIÓ DE LA PARAOXONASA PON1 AMB L'ESTRÈS OXIDATIU EN L'AFECTACIÓ MICROVASCULAR  
EN RETINOPATIA DIABÈTICA  
Patricia Pujol Gomis

Patricia Pujol Gomis

# RELACIÓ DE LA PARAOXONASA PON 1 AMB L'ESTRÈS OXIDATIU EN L'AFECTACIÓ MICROVASCULAR EN LA RETINOPATIA DIABÈTICA

TESI DOCTORAL

dirigida pel Dr. Pere Romero Aroca

Departament de Medicina i Cirurgia

Unitat d'Oftalmologia



UNIVERSITAT  
ROVIRA i VIRGILI

Reus, 2018

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
RELACIÓ DE LA PARAOXONASA PON1 AMB L'ESTRÈS OXIDATIU EN L'AFECTACIÓ MICROVASCULAR  
EN RETINOPATIA DIABÈTICA  
Patricia Pujol Gomis



UNIVERSITAT  
ROVIRA I VIRGILI

Carrer Sant Llorenç s/n

43202 Reus

El treball titulat: "*Relació de la paraoxonasa PON 1 amb l'estrès oxidatiu en l'afectació microvascular en la retinopatia diabètica*" que presenta la Doctorand PATRÍCIA PUJOL GOMIS, per obtenir el grau de Doctor, ha estat realitzat sota la meua direcció en el Departament de Medicina i Cirurgia, d'aquesta Universitat, i reuneix els requeriments per optar a la menció de grau de Doctor.

Reus, Gener de 2018

El Director de la tesis doctoral



Dr. Pere Romero Aroca

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
RELACIÓ DE LA PARAOXONASA PON1 AMB L'ESTRÈS OXIDATIU EN L'AFECTACIÓ MICROVASCULAR  
EN RETINOPATIA DIABÈTICA  
Patricia Pujol Gomis

## AGRAÏMENTS

En primer lloc vull agrair al Dr. Pere Romero la oportunitat de poder fer aquest projecte de recerca sota la seva direcció. El suport rebut per part d'ell i dels seu equip, tan a nivell humà com a nivell científic, va ser el que va engegar l'entusiasme d'aquest projecte que sense ell de ben segur no hauria estat el mateix. Potser sense els seus correus electrònics recordant-me que em retrassava en presentar-li els resultats, no hauria estat possible tenir aquests papers que tenim entre les mans.

No em puc oblidar de totes les persones que m'han ajudat en cada una de les parts d'aquest estudi...en la recollida de mostres de vitri tots el oftalmòlegs del departament de Retina de l'Hospital Sant Joan de Reus: el Dr. Marc Baget, el Dr. Àngel Bautista i el mateix Dr. Pere Romero, juntament amb tot l'equip d'infermeria de quiròfan. I en la recollida de mostres de sang, tot i que he practicat les meves habilitats en extracció de sang, he de reconèixer que en pacients diabètics amb vasos difícils no dominava massa el tema...així que també moltes gràcies al personal d'infermeria del Hospital Sant Joan de Reus i també a la Eulàlia Oriol, infermera i una de les meves millors amigues que no va dubtar ni un moment a venir-me a fer-me extraccions amb un obrir i tancar d'ulls.

Després de la recollida les mostres han estat rebudes amb els braços oberts pel personal de l'Institut d'Investigacions Biomèdiques Pere Virgili, i particularment pel Dr. Camps, un dels directors del Centre i per l'Anabel Garcia, biòloga col·laboradora que domina el SPSS a una velocitat que gràcies a ella podem veure els resultats ara i no d'aquí 3 anys.

I per finalitzar només vull anomenar els que han estat allà en totes les etapes d'aquesta tesi: les meves amigues "les flors", els meus pares i el meu marit Francesc. Ells m'han donat ànims, m'han aguantat, i m'han donat suport moral.



*"Si bé busques, trobaràs"*

Plató (filòsof grec)







---

ABREVIATURES .....	pàg. 19
PRESENTACIÓ I JUSTIFICACIÓ .....	pàg. 25
INTRODUCCIÓ .....	pàg. 29
1. ASPECTES GENERALS DE LA DIABETES MELLITUS .....	pàg. 31
1.1 Afectació multisistèmica en la diabetis mellitus .....	pàg. 31
1.2 Complicacions oculars de la diabetis mellitus .....	pàg. 33
2. RETINOPATIA DIABÈTICA .....	pàg. 35
2.1 Generalitats de la retina .....	pàg. 35
2.2 Avaluació macular i mètodes diagnòstics complementaris .....	pàg. 40
2.3 Bases fisiopatogèniques de la retinopatia diabètica .....	pàg. 44
3. LESIONS DE LA RETINOPATIA DIABÈTICA .....	pàg. 52
3.1 Signes oftalmoscòpics de retinopatia diabètica .....	pàg. 53
3.2 Maculopatia diabètica .....	pàg. 57
4. CLASSIFICACIÓ DE LA RETINOPATIA DIABÈTICA .....	pàg. 60
4.1 Classificació ETDRS .....	pàg. 61
4.2 Classificació internacional .....	pàg. 61
4.3 Classificació "convencional" o modificada de ETDRS .....	pàg. 62

5.	OPCIONES TERAPÈUTIQUES EN RETINOPATIA DIABÈTICA .....	pàg. 62
5.1	Fotocoagulació làser i crioteràpia .....	pàg. 62
5.2	Injeccions intravítrees .....	pàg. 63
5.3	Cirurgia vitreoretiniana .....	pàg. 64
6.	MANEIG DE LA RETINOPATIA DIABÈTICA .....	pàg. 65
6.1	Establiment de la primera exploració oftalmològica .....	pàg. 65
6.2	Seguiment .....	pàg. 66
6.3	Amb Retinopatia Diabètica inaparent .....	pàg. 66
6.4	Amb Retinopatia Diabètica lleu .....	pàg. 66
6.5	Amb Retinopatia Diabètica moderada .....	pàg. 67
6.6	Amb Retinopatia Diabètica severa .....	pàg. 67
7.	MANEIG DE L'EDEMA MACULAR .....	pàg. 68
7.1	Edema macular clínicament significatiu .....	pàg. 68
7.2	Edema macular difús .....	pàg. 68
7.3	Edema macular quístic .....	pàg. 69
7.4	Edema macular isquèmic .....	pàg. 70
7.5	Dipòsit lipídic passiu .....	pàg. 70
8.	LA INFLAMACIÓ I L'ESTRÉS OXIDATIU .....	pàg. 70
8.1	Sistemes antioxidants enzimàtics .....	pàg. 72
8.2	Sistemes antioxidants no enzimàtics .....	pàg. 73
8.3	Relació entre l'estrès oxidatiu i la inflamació .....	pàg. 73

9.	LES PARAOXONASES .....	pàg. 74
9.1	La Paraoxonasa 1 .....	pàg. 75
9.2	La Paraoxonasa 2 .....	pàg. 83
9.3	La Paraoxonasa 3 .....	pàg. 85
9.4	Les paraoxonases i les malalties no transmissibles .....	pàg. 86
	HIPÒTESI .....	pàg. 97
	OBJECTIUS .....	pàg. 101
	MATERIAL I MÈTODES .....	pàg. 105
	RESULTATS .....	pàg. 115
	Estudi PON .....	pàg. 119
	Estudi Membranes Retinianes .....	pàg. 135
	DISCUSSIÓ .....	pàg. 139
	CONCLUSIONS .....	pàg. 147
	BIBLIOGRAFIA .....	pàg. 151
	ANNEX .....	pàg. 191



## ABREVIATURES

---



---

4-HNE	hidroxi-2noneal
8-oxo-DG	8-oxo-2'-deoxyguanosina
ABCA-1	transportador ATP-binding cassette-1
ADA	associació americana de Diabetis
ADN	àcid desoxirribonucleic
AGF	angiografia fluoresceínica
AGEs	productes finals de la glicació avançada
AMIR	anomalies microvasculars intraretinianes
AMP	monofosfat d'adenosina-5
AMPK	proteïna quinasa aldèhid
Apo-AI	apolipoproteïna A-I
Apo-AII	apolipoproteïna A-II
AV	agudeses visual
BFGF	factor de creixement dels fibroblasts
BHR	barrera hematorretiniana
BHRE	barrera hematorretiniana externa
BHRI	barrera hematorretiniana interna
BMC	biomicroscòpia òptica
MC	biomicroscòpia
C	cisteïna
CCG	crio-coagulació
CCL2	molècules d'adhesió de cèl·lules endotelials
CHD	malaltia de les artèries coronàries
CO <sub>2</sub>	diòxid de carboni
CVR	cirurgia vitreoretiniana
CV	cardiovascular
D	diacilglicerol
DCCT	double control and complications trial

DD	diàmetre disc òptic
DM	diabetis mellitus
DMAE	degeneració macular associada a la edat
DSLp	dislipèmia
DR	desprendiment de retina
ELM	membrana limitant externa
EM	edema macular
EMCS	edema macular clínicament significatiu
EMD	edema macular diabètic
EMI	edema macular isquèmic
EMQ	edema macular quístic
EPR	epiteli pigmentari de la retina
ER	reticle endoplasmàtic
ERG-mf	electrorretinograma multifocal
ETDRS	Early Treatment Diabetic Study
FM	forat macular
FR	fotoreceptor
G	glicina
GAA	glaucoma d'angle obert
GH	hormona de creixement
GNV	glaucoma neovascular
GSH	glutatió
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peròxid d'hidrogen
HbA1c	hemoglobina glicosilada
HDL	lipoproteïna d'alta densitat
HGF	factor de creixement dels hepatòcits
HNE	4-hydroxy-2-nonenal
HTA	hipertensió arterial
ICAM	molècula d'adhesió intercel·lular
ICAM-1	molècula d'adhesió intracel·lular-1
IGF-1	factor de creixement similar a insulina

IISPV	Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili
IL-1 $\beta$	interleucina 1 $\beta$
IR	insuficiència renal
IV	intravitri
JAMs	molècules d'adhesió
L	leucina
LDL	lipoproteïna de baixa densitat
LÍNIA ELM	línia de la membrana limitant externa
LÍNIA IS/OS	inner segment / outer segment
LP	lipoproteïna
M	metionina
MA	microaneurismes
MCP-1	proteïna quimioattractant de monòcits
MCV	malalties cardiovasculars
MD	maculopatia diabètica
MDA	malondialdehid
MER	membrana epiretiniana
MLI	membrana limitant interna
MNT	malalties no transmissibles
mRNA	àcid ribonucleic missatger
NAFLD	malaltia hepàtica greixosa no alcohòlica
NASH	esteatohepatitis no alcohòlica
NO	òxid nítrós
NOD	receptor tipus proteïna de domini d'oligomeització
NV	neovascularització
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	superòxid
OCT	tomografia de coherència òptica
OMS	organització mundial de la salut
OPL	capa plexiforme externa
OVCR	obstrucció vena central de la retina
oxLDL	lipoproteïna de baixa densitat oxidades

PA	pressió arterial
PEDF	pigment epithelium derived factor
PFCG	panretinofotocoagulació
PIO	pressió intraocular
PKC	protein-kinasa C
PL	percepció de llum
O <sub>2</sub>	oxigen
OVCR	oclusió vena central de la retina
RN	retina neurosensorial
ROS	espècies reactives d'oxigen
RD	retinopatia diabètica
RDLL	retinopatia diabètica lleu
RDM	retinopatia diabètica moderada
RDNP	retinopatia diabètica no proliferativa
RDP	retinopatia diabètica proliferativa
RDS	retinopatia diabètica severa
SAA	proteïna del sèrum amilode
SOD	superòxid dismutasa
TAIV	triamcinolona acetònid intravitrea
TBBL	5-tiobutil butirolactona
TGF-beta	factor de creixement transformador beta
TNF-alfa	necrosi tumoral alfa
UKPDS	United Kingdom prospective diabetes study
UPD	uridin-difosfat-N-acetil-glucosamina
UPR	resposta a proteïnes no desenvolupada
VCAM	molècules d'adhesió cel·lular vascular
VEGF	vascular endothelial growth factor
VLDL	lipoproteïnes de molt baixa densitat
ZAF	zona avascular de la fòvea





Les lipoproteïnes de baixa densitat (LDL) oxidades han demostrat ser citotòxiques per a les cèl·lules endotelials dels capil·lars de la retina i els perícits, també presents en la membrana basal, ja que estan implicades en el mecanisme un mecanisme que contribueix al desenvolupament de la retinopatia diabètica. El reconeixement de la implicació directa de les LDL oxidades en el dany directe a nivell vascular desperta un gran interès alhora de poder aconseguir mecanismes que impedeixen aquesta oxidació. Un d'aquests mecanismes de prevenció recau en les lipoproteïnes d'alta densitat, que sembla disminuir l'acumulació de peròxids de lípids de lipoproteïnes de baixa densitat gràcies a un mecanisme, en part, enzimàtic: l'enzim associat a les lipoproteïnes d'alta densitat és la paraoxonasa 1 (PON1).

Fins a dia d'avui s'ha observat que l'activitat PON1 està disminuïda en diabètics, associa un augment de la peroxidació de lípids que contribueix a ser un factor determinant per a la predisposició de les complicacions de la diabetis mellitus (DM).



## INTRODUCCIÓ

---



## 1. ASPECTES GENERALS DE LA DIABETES MELLITUS

### 1.1 Afectació multisistèmica en la diabetes mellitus

La DM engloba un conjunt de malalties metabòliques caracteritzades per l'aparició de hiperglucèmia. La patogènia d'aquestes malalties recau en un defecte en la secreció de insulina, un defecte en l'acció de la insulina en el teixits perifèrics, o una combinació de ambos mecanismes. En qualsevol cas, sigui quin sigui el mecanisme desencadenant, la hiperglucèmia mantinguda de forma crònica dóna lloc a un augment del risc de desenvolupar complicacions vasculars diabètiques, bé sigui en forma de malaltia cardiovascular, cerebrovascular o vascular perifèrica (complicacions macrovasculars), o bé en forma de retinopatia, neuropatia o nefropatia diabètica (complicacions microvasculars).<sup>1</sup>

El diagnòstic de la DM es realitza seguint els criteris acceptats internacionalment, descrits en primer lloc per l'Associació Americana de Diabetis (ADA) el 1997<sup>2</sup>, posteriorment acceptats per la Organització Mundial de la Salut (OMS) el 1993<sup>3</sup>, i mantinguts en les últimes actualitzacions de ambos organitzacions.<sup>1,4</sup> (Taula 1)

Diabetes Test	Diagnosis of Diabetes	Increased risk (Prediabetes)/IFG
<b>HbA1c</b> Using a method certified by NGSP and standardized to the DCCT assay. or	>6.5%	5.7-6,5%
<b>Fasting Plasma Glucose</b> Fasting is defined as no caloric intake for at least 8 hours or	>126 mg/dL (7.0mmol/L)	100-125 mg/dL (6.9 mmol/L)

<b>2 Hour Plasma Glucose (OGTT)</b>		
The test should be performed as described by the WHO, using a glucose load containing the equivalent of 75 g anhydrous glucose dissolved in water.	>200 mg/dL (11.1 mmol/L)	140-199 mg/dL (7.8-11.0 mmol/L)

**Taula 1.** Criteris diagnòstics de la DM per ADA

### Classificació de la diabetis mellitus

La DM es classifica en quatre tipus ben diferenciats i amb característiques pròpies:

**La DM Tipo 1 (DM1):** entre el 5-10% de tots els casos de DM, com a resultat de un dèficit total de producció pancreàtica de insulina degut a la destrucció de la cèl·lula beta pancreàtica. Clàssicament es manifesta en les tres primeres dècades de la vida. És necessària l'administració exògena d'insulina per aconseguir un bon control metabòlic de la malaltia.

**La DM Tipus 2 (DM2):** entre el 90-95% de tots els casos de DM, com a conseqüència del desenvolupament de una resistència a la acció de la insulina en els teixits perifèrics, generalment acompanyat d'un dèficit relatiu de insulina en les primeres fases, que pot arribar a ser absolut en les fases més avançades de la malaltia. Se sol acompanyar d'obesitat, ja que és el seu factor de risc principal. Sol aparèixer a partir de la tercera dècada de la vida. El control de la glucèmia requereix seguir una dieta equilibrada podent ser necessari l'ús de fàrmacs hipoglucemiants i/o d'insulina exògena.

**La Diabetis Gestacional:** entre el 2-5% de les dones gestants. Està causada per la combinació del dèficit de producció relativa d'insulina juntament amb l'aparició de resistència cel·lular a la mateixa. Aproximadament un 30% d'aquestes pacients evolucionaran a la DM2.

### El control metabòlic del pacient diabètic

En l'actualitat la única forma que coneixem de disminuir la taxa de complicacions en els pacients amb diabetis es mitjançant un control glicèmia adequat, lo més a prop possible al que presenten els individus no diabètics. La forma adequada de mesurar aquest control glucèmic es la

determinació dels nivells de hemoglobina glucosilada (HbA1c). Per a aconseguir aquest suposat control metabòlic òptim actualment es disposa de un ampli i variat arsenal terapèutic que intenta pal·liar la diabetis actuant sobre diferents punts de la fisiopatologia de la malaltia:

- inhibidors de la alfa-glucosidasa: dificulten la absorció de hidrats de carboni a nivell de les vellositats intestinals, reduint la glicèmia postprandial.
- Sulfonilurees i gliadines: secretagogs de insulina, estimulen la producció i secreció de insulina per art del pàncreas.
- Biguanidines i glitazones: afecten a la resposta a la insulina, redueixen la producció hepàtica de glucosa ja que disminueixen la neogluco gensis i la glucogenòlisi hepàtica.
- Incretin-mimètics: sistema d'hormones incetines que augmenten l'efecte incretin al inhibir el metabolisme d'aquestes.
- Humanes i anàlegs: insulina recombinant humana, semblant a la insulina humana però amb modificacions en la seva estructura que fan que es reproduïxi de forma més fisiològica el perfil de secreció de insulina dels no diabètics.

## 1.2 Complicacions oculars de la diabetis mellitus

Amb el pas dels anys la gran majoria de diabètics desenvolupen algun grau de retinopatia. Aquest percentatge va creixent progressivament degut al desenvolupament de nous tractaments i a canvis en l'estil de vida que condueixen a un millor control sistèmic de la diabetis. Això comporta un increment de l'esperança de vida, però sense dubte també un augment en la prevalença d'aquelles complicacions que requereixen d'un cert període de temps per desenvolupar-se, com es el cas de la retinopatia.

En l'any 2015 hi havia 387 milions de persones en tot el món afectades de DM, de les que un 50% no estaven diagnosticades. La DM ha anat augmentat llocs en el rànquing mundial de causes de mortalitat. Es preveu un ràpid increment del número de casos nous en tot el món, fins arribar a 592 milions de diabètics al 2035. Aquestes xifres mostren la gravetat d'aquesta epidèmia global, ja catalogada per la OMS. La conseqüència del increment d'aquesta malaltia es reflexa clarament en la càrrega que representa pels serveis sanitaris.<sup>5,6,7</sup>

La denominada diabetis ocular inclou, no només la retinopatia diabètica (RD) sinó també altres manifestacions clíniques que poden comprometre diverses estructures oculars, alterant de

manera aïllada o afegida a la agudesia visual<sup>8</sup>. Aquestes anomalies poden presentar-se de forma aïllada o coexistir entre elles.

La prevalença de la DM en la població general oscil·la entre 6-10%<sup>9</sup>, i casi el 50% de la població diabètica desconeix tenir dita condició, i no es infreqüent que la troballa casual de una malaltia ocular associada inicií la sospita que condueix al diagnòstic<sup>8</sup>. Així hem de tenir en compte altres anomalies oculars relacionades amb la DM. **(Taula 2)**

Annexes i superfície ocular	Glicolàcia Anomalies vasculares conjuntivals Xantelasma Blefarconjuntivitis
Còrnia	Anomalies en la membrana basal epitelial i resposta cicatricial Hipoestèsia
Glaucoma	Augment incidència de glaucoma d'angle obert (GAA) Augment risc tancament angular Rubeosis iris i glaucoma neovascular (GNV)
Iris	Neovascularització Vacuolització del epitel·li pigmentari (EPR) Dispersió de pigment
Úvea	Alteracions vasculares Hiperpermeabilitat
Cristal·lí	Canvis osmòtics Cataracta precoç Cataracta diabètica juvenil
Vitri	Engruiximent còrtex vitri Proliferacions fibrovasculares Desprendiment parcial o total del vitri Hemorràgies vítries Hialosis asteroïdea Sinèresis vítria
Retina	RPDBT Maculopatia diabètica Desprendiment de retina traccional o regmatògen Patologia secundària a oclusions vasculares
Patologies neurooftàlmiques	Alteracions pupil·lars Parèsies i paràlisi oculomotores (III, IV i VI parells cranials) Patologia del nervi òptic
Alteracions funcionals	Alteracions refractives i dificultat en l'acomodació Disminució sensibilitat al contrast Alteració de la visió dels colors
Infeccions	Endoftalmitis, mucormicosis rinocerebral

**Taula 2.** Complicacions oculars de la DM

## 2. RETINOPATIA DIABÈTICA

### 2.1 Generalitats de la retina

La retina és un teixit neural d'estructura complexa, multiestratificat i compost per diferents tipus cel·lulars. Es disposa a mode de capa i es localitza a la part més interna del segment posterior de l'ull de manera que està en contacte directe amb l'humor vitri. (Figura 1)

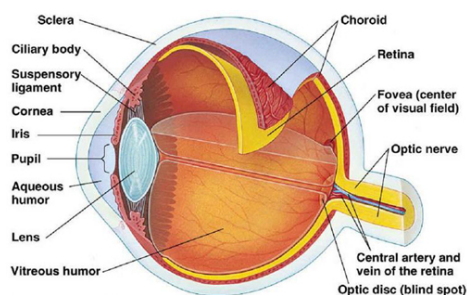


Figura 1. Estructures anatòmiques oculars principals

Topogràficament la retina es divideix en tres zones; la màcula o pol posterior que és la zona visualitzada en una retinografia, la retina equatorial i la perifèria retiniana, que és la retina compresa entre l'equador i l'ora serrada, coincidint amb la finalització de la retina a nivell anterior.

#### La màcula

La màcula és la part de la retina delimitada verticalment per les dues arcades vasculars temporals. Es localitza per tant, temporal al nervi òptic. Aquesta àrea rep també el nom d'àrea central o pol posterior de la retina. És la zona responsable de percebre la màxima agudeses visual, els colors i copsar els 200 centrals de visió.

La màcula és l'àrea de la retina que genera més interès el seu estudi. Aquest fet, s'explica per la importància funcional que té junt a què s'hi concentra la majoria de la patologia mèdica i quirúrgica de la retina. En la màcula, es diferencien les següents parts (Figura 2):

Foveola: formada per la depressió central circular de 0,35 mm de diàmetre. Hi resideix la major densitat de cons ( $199000/\text{mm}^2$ ), sent responsable de la màxima agudeses visual (AV) i de la

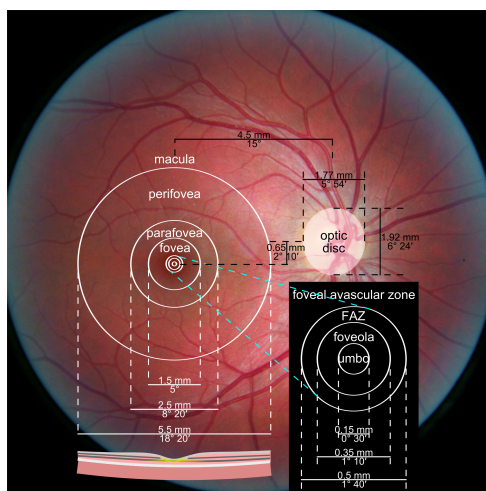
percepció del color.

Zona avascular de la fòvea (ZAF): petita àrea central de aproximadament 500 micres sense la presència de vasos retinians, amb l'objectiu de no interferir amb la visió. Al seu voltant però, existeix una xarxa de capil·lars perifoveals. En la RDBT tot sovint s'observa amputació o dilatació aneurismàtica dels capil·lars perifoveals podent causar isquèmia i edema macular.

Fòvea: àrea localitzada a la part central de la màcula amb un diàmetre de 1500  $\mu\text{m}$  (micres) equivalent a un diàmetre de disc òptic (DD). S'hi troben els cons i en menor quantitat, cèl·lules de Müller. És responsable de percebre els 5<sup>º</sup> centrals del camp visual.

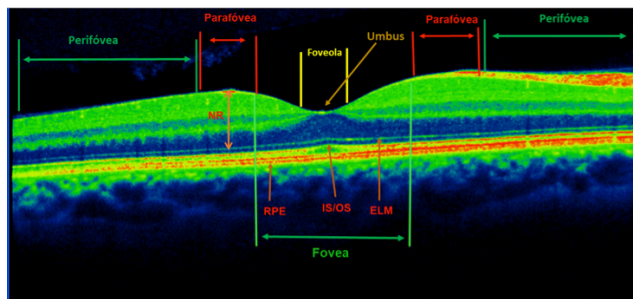
Parafòvea: cinturó de 500 micres al voltant de la fòvea. És on es troba la major quantitat de cèl·lules nervioses (7 fileres de cèl·lules ganglionars, 12 de bipolars, 4 ó 5 de nuclis de fotoreceptors) sent la capa plexiforme externa (OPL) més gruixuda.

Perifòvea: excèntrica a la parafòvea. En aquest punt, la retina comença a aprimar-se progressivament fins a l'ora serrata, on augmenta la presència de bastons i no s'hi troben cons.



**Figura 2.** Parts de la màcula. FAZ: Zona avascular de la fòvea

La retina es divideix des d'un punt de vista anatómic en retina neurosensorial (RN) i l'epiteli pigmentari de la retina (EPR). (Figura 3)



**Figura 3.** Tall sagital de la retina visualitzat mitjançant tomografia de coherència òptica. NR: neurosensorial retina, RPE: retinal pigment epithelium, Línia IS/OS o elipsoide: inner segment/oter segment dels fotoreceptors, Línia ELM: external limiting membrane

La RN comprèn el conjunt d'estrats on es troben els fotoreceptors (FRs) i el conjunt de cèl·lules neuronals i glials de la retina, té la funció de convertir els fotons de llum que li arriben en estímuls elèctrics, fenomen que s'anomena transducció visual. Aquest procés és indispensable perquè el món exterior pugui ser interpretable pel cervell.

L'epiteli pigmentari de la retina (EPR) és una monocapa formada per un únic tipus cel·lular de cèl·lules cúbiques localitzada a la part més externa de la retina caracteritzades per l'elevada presència del pigment melanina en el seu citoplasma, d'aquí el seu nom. Aquest fet, li permet absorbir l'excés de llum que li arriba evitant la fototoxicitat de la retina. Per la part apical, les cèl·lules de l'EPR estan íntimament relacionades amb els fotoreceptors amb qui formen una vertadera unitat funcional. D'aquesta manera, intervenen conjuntament en el cicle visual en què es regenera el carotenoid *all-trans-retinol* en *11-cis-retinal*, procés imprescindible per a la visió. Al mateix temps, l'EPR subministra nutrients als FRs, destacant la vitamina A i la glucosa. També realitza una funció fagocítica eliminant els FRs defectuosos o envellits. Per la seva base, l'EPR està en contacte amb la coriocapil·lar que és una capa de la corioide constituïda per capil·lars fenestrats permetent així la difusió de molècules cap a l'EPR. Les cèl·lules de l'EPR mantenen una forta unió intercel·lular entre sí degut a la presència de tight junctions. Aquest fet, possibilita la seva funció de barrera hemato-retiniana externa (BHRE), permetent l'intercanvi controlat de substàncies entre la retina neurosensorial i la coriocapil·lar. L'EPR té una acció important de bombeig de líquid cap a la coriocapil·lar, sent aquest mecanisme molt important per tal d'evitar l'aparició d'edema macular (EM). De manera addicional, sintetitza diverses molècules entre les quals destaquen el VEGF (vascular endothelial growth factor) i el PEDF (pigment epithelium derived factor). El VEGF causa

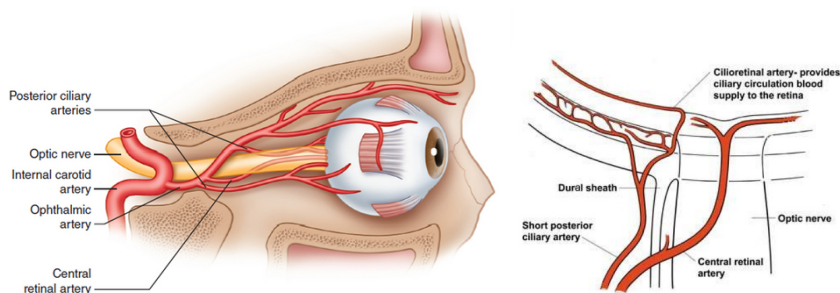
un augment de la permeabilitat vascular junt al seu conegut efecte angiogènic mentre que el PEDF, té una acció antagònica.

La **capa elipsoide antigament definida com línia inner segment / outer segment (IS/OS)** s'aprecia com una línia hiperreflectant situada just per sobre l'EPR. No està clara la seva correspondència anatòmica. Clàssicament, s'ha considerat que corresponia a la unió dels segments interns i externs dels fotoreceptors. En l'actualitat es pensa que podria representar la fracció el-lipsoide dels segments interns dels fotoreceptors motiu pel qual se l'anomena zona elipsoidea. Sigui quina sigui l'estructura dels FR que mostra aquesta capa, sembla important la relació que existeix entre el grau d'integritat de la capa elipsoide i el pronòstic visual final en certes patologies maculars. A major nivell de conservació de la capa el-lipsoide, millors perspectives de visió.

La **capa external limiting membrane (ELM)** es presenta a la tomografia de coherència òptica (OCT) com una línia discreta, lleugerament hiperreflectant, situada just per sobre la capa el-lipsoide. Es creu que aquesta membrana està formada per les unions fermes entre els segments interns dels fotoreceptors amb els processos apicals de les cèl·lules de Müller. A part de la funció estructural que se li atorga, sembla ser que forma part de la BHRE contribuint a evitar la difusió de macromolècules entre la retina interna i externa. Per tant, la seva disfunció podria contribuir a l'aparició d'edema en la retina amb la consegüent pèrdua de l'homeòstasi retiniana.

### **Vascularització de la retina**

L'ull és l'òrgan del cos humà que en termes relatius rep un major aport sanguini per a fer front a l'enorme requeriment energètic que comporta el fenomen de la visió. La vascularització de la retina té un doble origen: la circulació retiniana i la coroidea les quals, no es comuniquen entre sí. La retina externa, que comprèn l'EPR i els FRs, es nodreix de la capa vascular subjacent, la coriocapil·lar, la qual està regulada pel sistema nerviós simpàtic. La retina interna està irrigada per branques procedents de l'arteria central de la retina que acaben generant dos plexes capil·lars diferenciats que s'anastomosin. (Figura 4)



**Figura 4.** ( cedida per [www.retinarefernce.com](http://www.retinarefernce.com)) Trajecte de l'artèria central de la retina

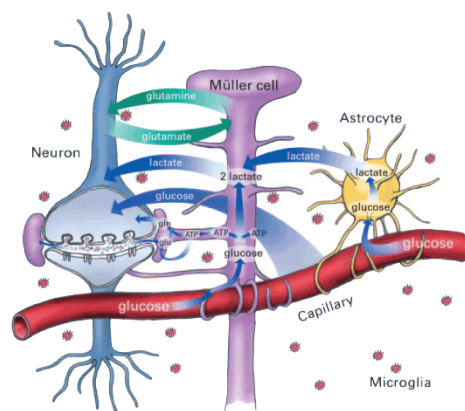
### La barrera hematoretiniana interna

La retina, a l'igual que el cervell<sup>9</sup>, disposa de mecanismes que dificulten l'entrada de certes molècules i microorganismes al seu parènquima disminuint així, el risc d'aparició de fenòmens inflamatoris o infecciosos. Aquest fet, ve determinat per l'anatomia singular dels capil·lars de la retina.<sup>10-12</sup>

Les cèl·lules endotelials dels plexes capil·lars de la retina, mantenen una unió molt forta degut a la presència de tight junctions que sellen l'espai intercel·lular<sup>13</sup>. Rodejant les cèl·lules endotelials es troben els perícits<sup>14</sup>, i per fora d'aquests, els astròcits. Tot plegat constitueix la barrera hematoretiniana interna (BHRI). (Figura 5)

Els perícits actuen a mode de cèl·lules musculars llises regulant la llum dels capil·lars de la retina. Mitjançant la seva contracció o dilatació, es controla la perfusió retiniana.

La circulació retiniana, a diferència de la coroidea, no està sotmesa al control del sistema nerviós vegetatiu sinó que es capaç d'autoregular-se en funció de paràmetres locals (pH<sup>15</sup>, temperatura, O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, lactat<sup>16</sup>) i factors generals (angiotensina, vasopressina). Els perícits i les cèl·lules glials (astròcits i cèl·lules de Müller) al mateix temps, produeixen factors que modifiquen la funció endotelial. Així per exemple, en presència del VEGF o de l'òxid nítric<sup>17</sup>(NO), es produeix un augment de la permeabilitat capil·lar al disminuir la ocludina<sup>18</sup>, una proteïna responsable de mantenir les tight junctions de les cèl·lules endotelials<sup>19</sup>. De manera patològica, algunes citoquines<sup>20</sup>, els AGEs<sup>21</sup> o la hiperglicèmia mateixa<sup>22</sup>, produeixen canvis estructurals i funcionals de la BHRI facilitant l'aparició de l'EM.



**Figura 5.** (imatge cedida per American Diabetes Association, Inc.). Dibuix esquemàtic de la BHR

## 2.2 Avaluació macular i mètodes diagnòstics complementaris

### Avaluació anatòmica

En la valoració inicial macular dels pacients diabètics s'utilitzen mètodes qualitius que també són de cribratge, com són la biomicroscòpia (BMC) indirecte i la retinografia del pol posterior de l'ull. Si es sospita la presència d'un edema macular diabètic (EMD), aleshores cal un estudi més exhaustiu sent necessari la pràctica d'una angiografia fluoresceínica (AGF) i d'una OCT.

### **Mètodes qualitius**

Degut a la importància funcional de la màcula, la majoria de proves complementàries realitzades en la retina es focalitzen en el seu estudi.

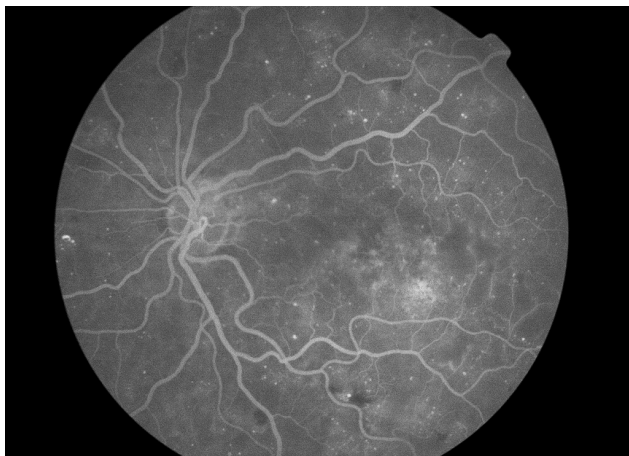
Biomicroscòpia indirecte: consisteix en l'observació detallada de la màcula havent dilatat prèviament la pupila del pacient<sup>23</sup>. Es pot utilitzar una lent de contacte recolzada sobre la superfície corneal (previ l'ús d'anestèsic tòpic) o bé una de no contacte. Permet l'observació directa de microaneurismes, exsudats lipídics o quists foveals, tots ells signes indirectes d'un edema macular<sup>24-28</sup>. Retinòlegs entrenats poden visualitzar l'edema macular al ser una tècnica d'exploració tridimensional. De manera addicional, es pot objectivar l'adhesió o bé el desprendiment de la hialoide posterior.

La BMC indirecte té l'inconvenient de ser una prova subjectiva i per tant, poc apte per a la comparació interindividual o intraindividual<sup>29</sup>.

Retinografia: consisteix en prendre una fotografia del pol posterior de l'ull. De la mateixa manera que l'estudi biomicroscòpic, poden observar-se signes indicatius d'edema macular com són la presència d'hemorràgies, microaneurismes o exsudats lipídics. Té l'avantatge de poder modificar digitalment la imatge i de no precisar de la col·laboració del pacient. El seu principal desavantatge és no permetre l'observació directe de l'edema macular al ser una tècnica bidimensional. És àmpliament utilitzada com a mètode de cribratge en població diabètica per a detectar la RPDBT de manera precoç<sup>30</sup>.

Angiografia fluoresceínica: és una prova dinàmica que permet avaluar l'estat circulatori de la coroides i la retina, proporcionant molta informació sobre l'estat de l'àrea macular. Per tant, és una prova molt indicada en els pacients diabètics.

En l'AGF, s'introdueix la fluoresceïna a través d'una vena perifèrica per al cap d'uns segons, començar a observar com es distribueix aquest colorant per la doble circulació coroidea i retiniana. L'AGF permet d'entrada observar retrassos de la circulació ocular, de manera mono o binocular, generant la sospita d'isquèmia carotídea<sup>31</sup>. A nivell macular, el colorant realça la presència de microaneurismes permetent la identificació d'aquells que exsuden plasma<sup>32,33</sup>. En temps angiogràfics tardans permet diagnosticar l'existència d'edema macular a través de la perfusió de colorant per la superfície foveal<sup>34,35</sup>. Tot depenent del tamany de l'edema macular i el grau de relació que tingui amb els microaneurismes presents, es classificarà en focal, multifocal o difús<sup>36</sup>. Com més extens sigui l'EMD i menys microaneurismes s'observin, més probabilitats que sigui difús. A més a més, l'AGF dona informació sobre l'estat de la xarxa capil·lar perifoveal discriminant aquells pacients que presenten isquèmia macular<sup>37-43</sup>. **(Figura 6)**



**Figura 6.** Imatge angiogràfica que ens mostra microaneurismes propers ala zona macular, que estan exsudant fluid cap al a mateixa.

**Ecografia:** mètode basat en imatges obtingudes mitjançant el processament de ecos reflexats per les estructures oculars. Molt útil en RPDBT en casos de hemorràgia vítria, cataracta o qualsevol opacitat de medis, essencial per si es volgués programar una cirurgia. Utilitzem el mode A (amplitud) i el mode B (brillantor).

### **Mètodes quantitius**

**Tomografia de coherència òptica:** és una tècnica que permet l'obtenció d'imatges transversals de les diferents capes de la retina en alta resolució (al voltant de les 5-10 micres). El funcionament de l'OCT és similar al d'un ecògraf, però utilitza llum infraroja en comptes d'ultrasons, aconseguint d'aquesta manera una major definició de les imatges obtingudes.

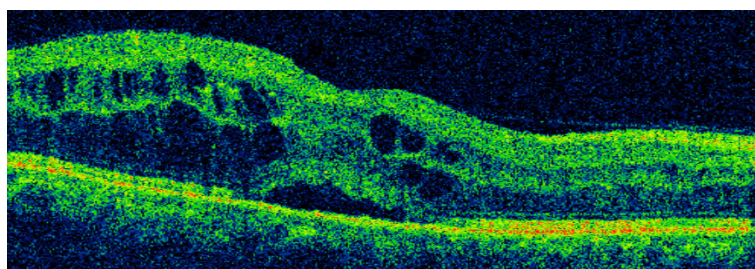
En l'OCT es dirigeix un feix de llum infraroja sobre la màcula el que permet inferir la seva estructura interna a través de mesurar el retràs de la llum reflexada per cadascuna de les diferents capes de la retina. Com més densa és la capa o la microestructura anatòmica, més llum es reflexa i viceversa. La informació tomogràfica macular final es mostra com una imatge topogràfica on les estructures hipereflectants adquireixen per conveni una tonalitat blanc-vermella i les hiporeflectants, un to blau-verdós. Les imatges es poden presentar en 2D o 3D.

La OCT es basa en la interferometria de baixa coherència. A mode de resum, en aquesta tècnica hi ha un làser díode que genera un feix de llum infraroja que al travessar un divisor, es

divideix en 2 feixos de llum: un *feix mostra* que va dirigit a la retina i un *feix de referència*, que va cap a un mirall situat a una distància coneguda. Mitjançant l'anàlisi en el detector dels camps magnètics dels feixos de llum mostra i de referència reflexats per la retina i el mirall coincidents en el temps (interferència), s'infereix l'estructura tomogràfica de la retina.

La OCT és una prova no invasiva que no precisa contacte sobre la superfície ocular. És la tècnica més sensible que es disposa en l'actualitat per a detectar la presència d'un edema macular<sup>44-46</sup>, permetent la seva diferenciació en subtipus atenent a la seva distribució histològica<sup>47</sup>.

L'OCT és una prova especialment útil per a l'estudi macular del pacient diabètic. Avalua amb detall la interfase vitreoretiniana podent visualitzar traccions de la fòvea exercida per la hialoide posterior, per membranes epiretinianes o pel propi frunziment de la membrana limitant interna<sup>48-50</sup>. Dibuixa perfectament bé la capa de fotoreceptors, la IS/OS i la ELM, totes elles importants de cara el pronòstic visual dels pacients<sup>51-53</sup>. A més a més, permet quantificar el gruix de l'edema macular a nivell del centre de la fòvea (CRT: central retinal thickness) mesurat en micres i el volum de tota l'àrea macular, mesurat en mm<sup>3</sup>, segons l'esquema del Early Treatment of Diabetic Retinopathy Study (ETDRS). La bona sensibilitat i especificitat de l'OCT junt a la facilitat de realitzar la prova, l'ha convertit en la millor eina per a l'estudi anatòmic i el seguiment del pacient diabètic amb edema macular. (Figura 7)



**Figura 7.** Imatge de OCT macular que ens mostra engruiximent macular amb edema macular quístic

### **Avaluació funcional**

Agudeses visual: la manera més fàcil de valorar la funció macular dels pacients amb EMD és a través del què veuen. Sota condicions estàndard, se'ls hi projecten uns optotipus que permeten mesurar el límit de la seva capacitat visual. En el present estudi, s'han utilitzats els optotipus ETDRS que

permeten quantificar el número exacte de lletres que els pacients són capaços de llegir i per tant, seguir la seva evolució. És el mètode més utilitzat degut a la seva facilitat de realització. No obstant, té l'inconvenient de ser subjectiu ja que està sotmès a la voluntat i motivació del pacient, així com a la interpretació de l'observador.

Electroretinograma multifocal (ERG-mf): és una eina que permet avaluar de manera objectiva la resposta electrofisiològica sectorial de la retina <sup>54</sup>, després d'aplicar-li un conjunt d'estímuls lumínics de manera protocol·litzada. Aquesta prova possibilita l'estudi electrofisiològic de la retina aproximadament dins dels 30 centrals de visió.

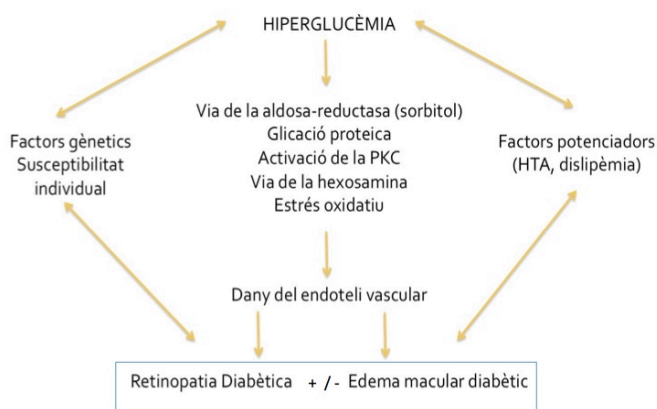
L'ERG-mf prové de l'electroretinograma de camp ampli o estàndard. L'electroretinograma estàndard avalua la resposta electrofisiològica global de la retina no permetent discriminar l'estat funcional de petites àrees dins la mateixa, com és la pròpia màcula <sup>55</sup>. Alteracions degut a un EMDBT poden comportar gran repercussió visual i en canvi, no traduir-se en una disminució de la funció global retiniana susceptible de ser detectada amb l'electroretinograma estàndard. Per aquest motiu, Sutter i Tran <sup>56</sup> van desenvolupar l'ERG-mf amb la intenció de conèixer la contribució que fa cada àrea predefinida de la retina dins del global de la resposta elèctrica del teixit retinià estimulat.

### **2.3 Bases fisiopatològiques de la retinopatia diabètica**

En un futur cada cop més pròxim, es presumible que el tractament mèdic de la retinopatia diabètica i de les seves complicacions estigui fonamentalment basat en el bloqueig farmacològic dels diferents mecanismes fisiopatològics de la malaltia. Per aquest motiu, i creient que es la base del nostre estudi, és imprescindible conèixer els principals conceptes patològics principalment involucrats, alguns dels quals s'ampliaran en capítols posteriors.

La retinopatia diabètica i l'edema macular diabètic són complicacions oculars que amb més freqüència apareixen com a conseqüència del compromís de la microvascularització retiniana associada a la DM. És ben conegut que la hiperglucèmia és la causa inicial que origina el dany tissular en els diferents òrgans afectats per la DM, i que en el seu tractament i control estricte constitueixen la única forma de controlar la progressió, com clarament estableixen estudis com DCCT (Diabetes Control and Complications Trial)<sup>57</sup> i el UKPDS (United Kingdom Prospective

Diabetes Study)<sup>58</sup>. Tanmateix, les alteracions que apareixen en la vascularització retiniana, i que són causants del desenvolupament de la RPD i de l'EMD, estan ben caracteritzades: alteracions del flux sanguini, alteracions de la permeabilitat vascular i falta de perfusió capil·lar<sup>59</sup> (hipòxia i isquèmia). Tot i així no estan clarament identificats els mecanismes exactes pels que la hiperglucèmia, i també la dislipèmia (DSL) i la hipertensió arterial (HTA), causen les alteracions descrites en els vasos sanguinis; de fet, a lo llarg dels anys han estat implicades varies rutes metabòliques en el desenvolupament de RD i EMD. (Figura 8)



**Figura 8.** Factors implicats en el desenvolupament. En la part central descriu els mecanismes bioquímics que succeeixen a nivell intracel·lular com a conseqüència de la hiperglucèmia.

A grans trets, i des del punt de vista fisiopatogènic, la retinopatia diabètica és una entitat que cronològicament, evoluciona en dues fases diferenciades. La primera d'elles representa el patiment passiu de les estructures afectades, mentre que la segona és una resposta que, permet ser compensadora, però resulta aberrant.

En la primera fase les alteracions bioquímiques, especialment la hiperglucèmia, deterioren progressivament el sistema microvascular de la retina, conduint a una situació d' hipòxia. El teixit retinià, en front a aquesta situació de hipoperfussió, posa en marxa uns mecanismes compensadors (vasodilatació i vasoproliferació), amb la finalitat d'augmentar el flux i la oxigenació. L'augment del flux i de la pressió en un arbre vascular merma estructural i funcionalment, i sense capacitat de resposta, origina alteracions hematològiques i parietals que agraven encara més l'estat dels vasos. El sistema d'autoregulació acaba per claudicar a tots els nivells. Davant la

incapacitat de resposta es posa en marxa el segon mecanismes de compensació, més inútil i aberrant i, a la par, més perillós: la vasoproliferació, amb la formació de neovasos i la proliferació de fibroblasts, iniciant-se així un procés de deteriorament desbocat e irreversible i que moltes vegades condueix indefectiblement al desastre.

Així, els mecanismes patogènics implicats en la evolució de la RPDBT podem agrupar-los en canvis bioquímics, fisiològics, hematològics, endocrinològics, factors capaços de induir neovascularització (NV) i anatòmics<sup>60</sup>. El desenvolupament i el progrés de la RPDBT probablement sigui secundari a complexes interaccions entre els diferents factors mencionats. D'entre tots els mecanismes suposadament implicats, sembla que les alteracions bioquímiques i fisiològiques són les més rellevants en les fases precoces de la malaltia, mentre que les anomalies endocrinològiques, amb la aparició dels factors inductors de neovasos, són especialment protagonistes en les fases més tardanes, abans de la fase prolifrativa.

#### Anomalies bioquímiques

La majoria de les cèl·lules són capaces de reduir el transport de glucosa al seu interior quan la glucèmia del medi extracel·lular està elevada, de forma que la concentració intracel·lular de glucosa es manté constant tot i trobar-se en un medi amb hiperglucèmia. Aquelles cèl·lules que no siguin capaces de reduir el transport de glucosa al seu interior són les que patiran danys. Aquest sembla ser el motiu pel que la DM danya de forma selectiva les cèl·lules endotelials retinianes així com a les cèl·lules mesangials del glomèrul renal i les neurones de les cèl·lules de Schwann dels nervis perifèrics, les quals, la tasa de transport de glucosa al espai intracel·lular no disminueix ràpidament davant la hiperglucèmia, per lo que els nivells intracel·lulars de glucosa augmenten anormalment en aquestes cèl·lules. Aquest fet ratifica que la última causa del desenvolupament de la RD i EMD resideix en l'interior cel·lular, no en l'ambient extracel·lular<sup>61</sup>.

Els mecanismes bioquímics responsables del inici i perpetuació de les alteracions vasculars que donen lloc a les complicacions microvasculars de la RD són:

- cúmul de sorbitol la enzima aldosa-reductasa davant un augment de glucosa intracel·lular augmentat, la converteix amb sorbitol, de manera que aquest excés de sorbitol intracel·lular produeix dany celular<sup>59</sup> i també augmenta la susceptibilitat cel·lular al estrès oxidatiu<sup>62</sup>.

- glicosilació proteica produïda de forma irreversible a causa de la hiperglucèmia mantinguda, mitjançant la interacció no enzimàtica de la glucosa amb els residus de lisina de les cadenes d'aminoàcids. Per aquest mecanisme es forma la HbA1c.
- activació de la proteïna kinasa C (PKC) concretament la seva isoforma B, de manera crònica en el teixit vascular dels diabètics degut a que la hiperglucèmia intracel·lular augmenta la síntesis dels seus cofactors (diacil-glicerol (DAG))<sup>63</sup>, produint múltiples alteracions vasculars retinianes.
- augment de la activitat de la via de la hexosamina degut a hiperglucèmia intracel·lular que produeix UDP (uridin difosfat-N- acetil- glucosamina) que interacciona amb els residus de serina i treonina dels factors de transcripció, donant lloc a canvis patològics en la expressió genètica<sup>64</sup>.
- l'estrès oxidatiu es postula com a nexa d'unió entre les quatre vies anteriorment mencionades, ja que la producció de superòxid i altres metabòlits de l'estrès oxidatiu per part de la cadena transportadora de electrons de la mitocòndria, induït per la hiperglucèmia, podria ser el punt comú, el nexa que originaria totes les alteracions descrites<sup>65</sup>. La PON1 va ser considerada durant molts anys una esterasa que podia degradar organofosforats. El descobriment de que PON1 podia prevenir l'oxidació de les LDL, lligant-la amb la malaltia cardiovascular, va desencadenar un boom en l'interès científic d'aquest enzim. Avui en dia se'l considera un enzim molt important a l'hora de prevenir l'estrès oxidatiu. L'estrès oxidatiu indueix una resposta inflamatòria mediada principalment per la proteïna quimioquina-1(MCP-1). Però PON1 sembla que té la capacitat d'inhibir la producció de chemokine C-C motif ligand 2 (CCL2). Així doncs, PON1 també tindria una funció antiinflamatòria. Les HDL tenen un paper anti-apoptòtic que perden quan s'oxiden. PON1 també pot prevenir l'oxidació de l'HDL, així que PON1 també pot tenir una funció anti-apoptòtica. Estrès oxidatiu, inflamació i apoptosi són doncs, tres accions contra les quals PON1 sembla jugar un paper fonamental.

### Disfuncions fisiològiques

#### **Deteriorament de la autoregulació del flux sanguini**

La retina disposa d'un important mecanisme d'autoregulació del flux sanguini no molt ben conegut. Aquest mecanisme condiona un volum de flux igual en ambdós hemisferis (superior i inferior), però major en la retina temporal respecte a la nasal. Igualment, i a pesar de que existeixin canvis en la pressió de perfusió, aquest mecanisme garanteix un flux molt pròxim al normal i fa que la velocitat sanguínia en els grans vasos retinians sigui, en igualtat de condicions, constant tan

a curt plac (hores) com a llarg plac (mesos)<sup>64</sup>. Per la seva part, el sistema nerviós simpàtic produeix una vasoconstricció uveal i sembla protegir d'una perfusió excessiva i de una ruptura de les barreres oculars davant una elevació aguda de la pressió arterial (PA). Així doncs podem dir que en la DM es poden deteriorar els mecanismes d'autoregulació del flux sanguini, segurament per alteracions del sistema nerviós autònom, ja que s'ha observat una relació entre neuropatia autonòmica i errades en la regulació del flux retinià<sup>65</sup>.

### **Disminució de la velocitat sanguínia**

La velocitat del flux retinià sembla ser que disminueix i és una de les primeres manifestacions clíniques en aparèixer, augmentat la viscositat sanguínia, la degeneració de perícits, constricció arteriolar i dilatació de la trama vascular i venular<sup>66</sup>.

### **Vasodilatació compensatòria**

També existeix vasodilatació compensatòria en arterioles i vènules en el pacients diabètics, com a possible mecanisme d'autoregulació per compensar la hipòxia retiniana, ja que, després de fer una panretinofotocoagulació (PFCG) el diàmetre vascular disminueix de forma significativa, possible signe indicador de una milloria en la oxigenació de les capes internes de la retina, i, per tant, de la eficàcia del tractament amb PFCG<sup>64,65</sup>.

### **Anomalies en la paret vascular**

La paret vascular pateix els efectes de la circulació alterada. el coeficient de roçament és superior al normal lo qual repercuteix negativament sobre la paret endotelial, que a la seva vegada ja presenta alteracions bioquímiques, de manera que l'endoteli pateix progressivament fins desaparèixer. Aquesta anomalia estructural augmenta la permeabilitat dels vasos amb sortida de plasma i proteïnes, sobretot a nivell capil·lar, ocasionant edema i exsudats durs. En les arterioles augmenta la permeabilitat i el roçament, ocasionant lesió endotelial i entrada de proteïnes en la paret vascular. La paret carregada de proteïnes i altres substàncies plasmàtiques augmenta el seu gruix, s'endureix i perd elasticitat. Aquest fet, associat a la pèrdua de perícits (cèl·lules contràctils), condiciona en la paret arteriolar la pèrdua de capacitat reguladora del flux i la pressió intravascular en un procés similar al de la arteriosclerosi i la hipertensió arterial. La retina és així incapaç de controlar de forma adequada els augments de perfusió<sup>67</sup>.

### **Disfuncions hematològiques**

Les alteracions hematològiques que apareixen en relació a la DM comprometen als elements formes de la sang (sobretot glòbuls rojos i plaquetes), i a la viscositat del plasma i la sang total.

### **Alteracions en els eritròcits**

Els glòbuls vermells juguen un paper important en el desenvolupament de les anomalies vasculars que apareixen en la RD, sobretot per l'augment de l'agregació i per la disminució de la deformabilitat que presenten. L'augment de la agregabilitat sembla condicionat pel nivell de control metabòlic i pel elevats nivells de proteïnes plasmàtiques<sup>67</sup>. La viscositat sanguínia depèn de la viscositat plasmàtica (determinada per les proteïnes del plasma), la deformabilitat i concentració de glòbuls rojos i la agregació plaquetària. Tots aquests factors es troben alterats en la DM.

### **Anomalies en la coagulació**

En el context de la DM existeixen una sèrie de factors que produeixen un estat de hipercoaguabilitat motivat en gran mesura per un augment de fibrinogen i factor VIII, així com una activitat fibrinolítica disminuïda<sup>68</sup>, els agregats de plaquetes i glòbuls rojos que es formen en el pacient diabètic poden no ser capaços de passar a través de les arterioles o dels petits capil·lars i ocloure parcial o completament aquests vasos. Aquestes oclusions focals podrien justificar l'aparició d'àrees focals d'isquèmia de la capa de fibres nervioses que es manifesten oftalmoscòpicament amb la presència d'exsudats tous. Les oclusions d'arteries de major diàmetre produeixen una situació d'hipòxia més disseminada en la retina. L'existència de microtrombosis des d'estadis inicials de la malaltia ha sigut confirmada de forma reiterada per AGF i per anatomia patològica. La oclusió capil·lar pot precedir als signes oftalmoscòpics, evidenciant en la AGF àrees de no perfusió (àrees hipofluorescents amb amputació i la trama capil·lar). Aquest fenomen empobreix considerablement el pronòstic visual quan es localitza a la màcula.

### **Factors inductors de neovascularització**

La retinopatia diabètica constitueix un exemple prototip de un grup de malalties englobades en les denominades retinopaties isquèmiques, caracteritzades per la presència d'extenses àrees de no perfusió capil·lar i pel desenvolupament de neovasos (angiogènesis intraocular). entre les substàncies implicades en el fenomen de la angiogènesis cal destacar les hormones (hormona de creixement, factor de creixement similar a la insulina, hormona del embaràs i la angiotensina II), els polipèptids (factor de creixement de fibroblasts, factor de creixement del endoteli vascular, factor transformador del creixement, entre altres) i els moduladors de la angiogènesis (heparina, heparin-sulfat i coure).

### **Hipòtesi de la neovascularització mediada per factors vasoproliferatius**

El procés mediat per factors d'estimulació que indueix la neovascularització intraocular té diverses fases:

- una primera fase on la DM, a través de mecanismes multifactorials, provoca anomalies vasculares en la retina que provoquen hipoperfusió i isquèmia retinana<sup>69</sup>.
- segona fase on aquests canvis estimulen la expressió i la secreció de factors de creixement a partir de diverses cèl·lules retinianes.
- tercera fase en què els factors vasoproliferatius difonen en el teixit retinià i a través del globus ocular, acoplant-se eventualment a receptors altament específics situats en les cèl·lules endotelials dels vasos.
- en una quarta fase, aquesta unió del factor amb el seu receptor indueix una sèrie de reaccions bioquímiques intracel·lulars que transmeten les senyals per activar la replicació cel·lular i augmentar la permeabilitat vascular.

Coneixen aquests mecanismes fisiopatogènics, qualsevol d'aquestes quatre fases podria ser interrompuda terapèuticament mitjançant preparats farmacològics adequats. En la regulació de la proliferació cel·lular, un cop la senyal intracel·lular es transmesa, influeixen nombroses molècules, com les sintegrines, angiostatina, endostatina i metaloproteinases, que també podrien ser teòricament inhibides farmacològicament.

## **Mediadors candidats capaços de induir neovasos**

Factors de creixement que poden influir com a possibles mediadors de la neovascularització intraocular mitjançant tres accions fonamentals: com estimuladors primaris de la angiogènesis, com factors permissius ( permeten l'acció dels factors primaris però sense induir l'estímul per si mateixos) i augmentant sinèrgicament l'acció d'altres factors.

Els principals factors de creixement o molècules mediadores són:

- Factor bàsic de creixement dels fibroblasts (BFGF): probablement actua com un factor potenciador en el desenvolupament de RD<sup>70,71</sup>.
- Hormona de creixement (GH) i factor de creixement similar a insulina (IGF-1) es creu que juguen un paper permissiu en la inducció d'ela isquèmia i no com un factor estimulador fonamental en la angiogènesis<sup>72-74</sup>.
- Factor de creixement dels hepatòcits (HGF) : les concentracions de HGF són més elevades en pacients amb retinopatia més activa i viceversa, però el seu paper com a mediador en retinopatia diabètica proliferativa (RDP) es desconeix<sup>75</sup>.
- Angiostatina i endostatina: són inhibidors endògens de la angiogènesis i tot i que es coneix la seva activitat antitumoral, es desconeix el seu paper en RD<sup>74</sup>.
- Factor de creixement del endoteli vascular: el VEGF és una proteïna amb una potent activitat angiogènica e inductora de permeabilitat vascular, els seus nivells es troben clarament elevats en humor vitri del pacients amb RDP en relació amb els pacients amb un grau de retinopatia diabètica no proliferativa (RDNP) o bé respecte a les formes proliferatives inactives o quiescents anatòmics<sup>57</sup>. Els nivells de VEGF intravitrins també estan elevats davant la presència de neovascularització secundària a altres patologies retinianes isquèmiques, com la oclusió de vena central de la retina (OVCR). L'augment de la permeabilitat dels vasos de la retina pot manifestar-se en absència de neovascularització, tot i així, una característica universal de tot estat de proliferació activa és l'augment de la permeabilitat vascular. Inclús en les fases més incipients de la RD, la retina expressa de forma precoç el VEGF i a més a més la seva resposta en front a l'estímul d'aquest factor està clarament potenciada.<sup>76</sup>. D'aquí que els inhibidors de la acció del VEGF puguin resultar beneficiosos no només per evitar les complicacions secundàries a la neovascularització i la hiperpermeabilitat vascular, sinó també per evitar la progressió de la retinopatia.

- **Protein Kinasa** : la hiperglucèmia que crea la DM produeix la aparició de canvis metabòlics i bioquímics, incloent l'estrès oxidatiu, la potenciació en la glicosilació del productes de desfet i la síntesi de diacilglicerol. Tots tres fenòmens indueixen l'activació de la PKC beta en la retina que produeix diverses anomalies bioquímiques associades al estat diabètic i induint la progressió de la RD. La activació de la PKC col·labora en el fenomen d'estimulació de l'expressió del VEGF junt amb la hipòxia i la hiperglicèmia<sup>77</sup>. Per tant, i des del punt de vista potencialment terapèutic, la inhibició de la PKC-beta resultaria en la inhibició de l'expressió del VEGF induïda per la hiperglicèmia, donant una atenuació dels efectes derivats de les complicacions vasculars de la DM.

### **Canvis anatòmics**

Aquests canvis formen part dels signes clínics que habitualment trobem en aquest pacients, destacaríem:

- pèrdua de cèl·lules murals (perícits) en la membrana basal dels capil·lars de la retina, lo qual facilita la dilatació focal de la paret capil·lar i posterior aparició de microaneurismes
- alteracions de la membrana basal capil·lar: primer hi ha un engruiximent progressiu, posterior vacuolització i s'infiltra de lípid i restes cel·lulars. Hi ha una disminució del diàmetre del vas i de la difusió de nutrients, afavorint la hipòxia tissular i la estimulació de la proliferació de cèl·lules endotelials.

## **3. LESIONS DE LA RETINOPATIA DIABÈTICA**

De totes les complicacions que la DM pot ocasionar a nivell ocular, la RPDBT és la que amb major freqüència condueix a la ceguesa (80%).<sup>78,79</sup>

Gràcies als grans estudis clínics portats a terme en les últimes dècades<sup>80,81</sup> se sap que, depenent del tipus, número i localització de les diferents lesions que apareixen en el fons d'ull, és possible establir una classificació o escala de severitat de la RD i contribuir amb això a identificar a temps les formes de risc i prevenir els nous casos de ceguesa per aquesta causa.

Se sap que és necessari un període de mínim de cinc a deu anys de hiperglucèmia mantinguda per a que comencin a manifestar-se les lesions microangiopàtiques. A més a més, en la seva hiperglucèmia flueixen determinats factors de risc, entre els quals destaca especialment el grau de control metabòlic. Després de la publicació dels resultats del DCCT i UKPDS és

universalment acceptat que existeix una correlació molt evident entre el grau de control metabòlic i el desenvolupament i la progressió de les complicacions oculars de la DM<sup>82-84</sup>.

La existència de uns nivells elevats i mantinguts de glucosa desencadena una sèrie d'alteracions bioquímiques i com a conseqüència en trobem un cúmul, en el diferents teixits, de poliols, radicals lliures i productes de glicosilació avançada que indueixen al augment de la síntesis de diacilglicerol i la activació de la PKC<sup>85,86</sup> (Figura 9) juntament amb canvis anatòmics i hematològics que caracteritzen la RD.

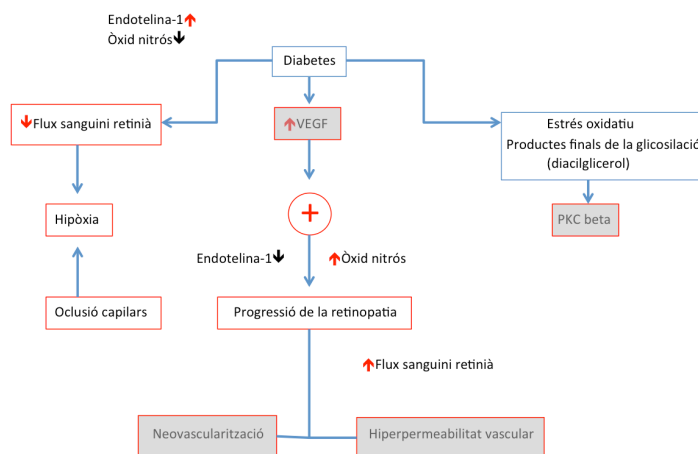


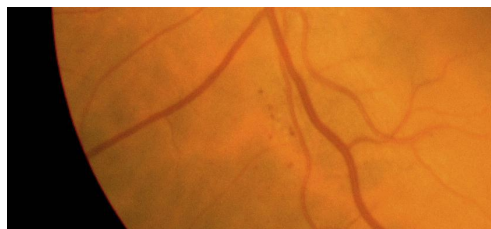
Figura 9. Aspectes fisiopatològics bàsics en el desenvolupament de la retinopatia diabètica i del edema macular

### 3.1 Signes oftalmoscòpics de retinopatia diabètica

Les lesions que apareixen en la RD no són patognomòniques, però, el context clínic en què es presenten, la distribució i el curs natural de la malaltia són altament específiques d'aquesta patologia. Des del punt de vista clínic es distingeixen dos tipus de RD: la forma no proliferant, en la que les alteracions que apareixen es relacionen sobretot amb l'augment de permeabilitat vascular, i la forma proliferant en la que predominen els fenòmens d'isquèmia i neovascularització.

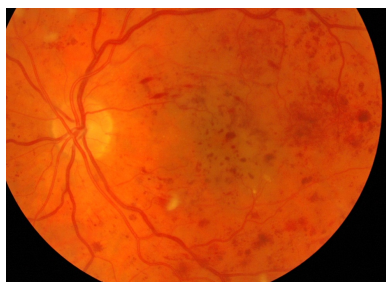
#### Lesions associades al augment de permeabilitat vascular

**Microaneurismes (MA):** dels primers signes oftalmoscòpics de RPDBT. Són dilatacions saculars de la paret dels vasos, sobretot venosos, que observem com punts vermells intraretinians, com a conseqüència de la pèrdua de pericits i la debilitat de la paret del vas. Se situen sobretot al pol posterior i costat temporal macular, medeixen de 15 a 50 micres. La AGF ens ajudarà a diferenciar-los de microhemorràgies. El seu número determina la gravetat de la RD. (Figura 9)



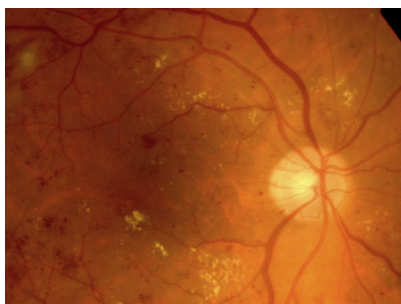
**Figura 9.** Imatge de retinografia ampliada que mostra microaneurismes vasculars

Hemorràgies intraretinanes: dels primers signes oftalmoscòpics de RD. Degudes a ruptura de MA o per alteració permeabilitat vascular capil·lar o de vènules (**Figura 10**). La quantitat d'hemorràgies augmenta conforme progressa la RD, per tant, tenen valor pronòstic.



**Figura 10.** Imatge de retinografia que mostra hemorràgies intraretinanes

Exsudats lipídics: o també denominats exsudats durs, apareixen clàssicament com dipòsits blanc-grocs ben definits, i corresponen a dipòsits extracel·lulars de lípids i lipoproteïnes que es produeixen com a conseqüència del augment de permeabilitat vascular. No són exclusius de la RD, però sí que són un signe típic de la malaltia. La localització, número i extensió dels exsudats durs guarda relació amb la gravetat de l'edema macular, però no amb la progressió de la RD (**Figura 11**)<sup>87-89</sup>.



**Figura 11.** Imatge de retinografia que mostra exsudats lipídics

### Lesions associades a fenòmens vasculars obstructius

Dipòsits cotonosos: detritus del flux axoplàsmic acumulats en la retina interna com a conseqüència de microinfarts a nivell de la capa de fibres nervioses per oclusió súbita d'arterioles precapilars. Apareixen com a formacions blanques ovalades, mal delimitades pròximes a la papil·la òptica i tenen un tamany d'entre 300 i 700 micres. No són patognomònics de la RPDBT, tot i que el seu número tendeix a augmentar amb la progressió de la RPDBT. (Figura 12)



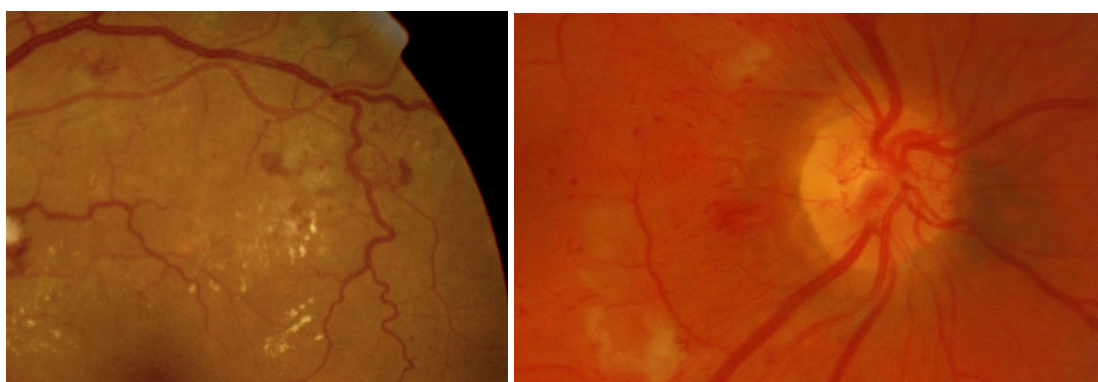
Figura 12. Imatge de retinografia que mostra dipòsits cotonosos

Anomalies vasculars retinianes i/o intraretinanes: la seva presència en un pacient amb RD constitueix un indicador molt fiable de progressió de la hipòxia retiniana, de la presència d'àrees d'isquèmia i de la possible evolució imminent de la RD cap a formes proliferants.<sup>90</sup> Poden ser de tipus venós (dilatació, tortuositat, duplicació, ases vasculars, envainament i exsudats perivenosos) o de tipus arterial (estenosis, envainament i oclusions). Tot i això la anomalia vascular més destacable i significativa de la tortuositat venosa i constitueix un dels indicadors més fiables de la progressió de la RD cap a una forma proliferativa. Poden coexistir diferents tipus d'anomalies vasculars. Les denominades anomalies microvasculars intraretinanes (AMIR) estan situades en la red capil·lar, sorgides com a resposta a la isquèmia retiniana focal. Definides com neovasos intraretinans incipients<sup>91</sup>, les AMIR són ases vasculars que s'originen a partir d'una vènula per acabar en una altra. Es diferencien amb la AGF dels neovasos superficials perquè no presenten fugues de contrast tan profuses<sup>92</sup>. el número de quadrants afectats per les AMIR determina el nivell de gravetat de la RDNP, i, la seva presència, junt amb la tortuositat venosa i la presència d'hemorràgies confluents constitueix un precursor molt significatiu de neovascularització imminent o present. (Figura 13)



**Figura 13.** Imatge de retinopatia diabètica severa, amb presència de bucles venosos, tortuositat vascular, hemorràgies abundants als 4 quadrants i molts exsudats durs, juntament amb edema macular

**Neovascularització:** La presència de neovasos en el disc òptic i/o damunt la superfície interna de la retina confirma inequívocament la existència d'una forma proliferant de RD. Els neovasos s'originen en els trams venosos de les zones d'isquèmia i sorgeixen com a resposta a la falta de perfusió i a la alliberació de factors angiogènics<sup>93,94</sup> Inicialment creixen en la retina per després de travessar la membrana limitant interna i estendre's cap a la hialoides posterior i cavitat vítria. En etapes més avançades de la malaltia s'acompanya en el seu creixement de un teixit fibrós que els hi serveix de suport (proliferacions fibrovasculars), augmenta la seva adherència a la hialoides posterior i, finalment, la contracció d'aquest teixit afavoreix l'aparició de complicacions (hemorràgia subhialoidea, hemorràgia vítria i desprendiment de retina traccional). **(Figura 14)**



**Figura 14.** Imatge de retinopatia diabètica severa, amb presència de neovasos. a) Neovasos a perifèria temporal b) Neovasos a papil·la

## **3.2 Maculopatia diabètica**

### Concepte i classificació

Engloba tots aquells canvis patològics, tant en l'estructura interna de la retina com en l'espai preretinià o subretinià, que afecten directament l'àrea macular en el context de una RD. Aquesta anomalia representa, particularment en la seva forma edematosa, la primera causa de pèrdua visual en la població diabètica amb edats compreses entre el 20 i 60 anys. característicament, l'afectació macular diabètica es manifesta més precoçment en la DM tipus 2.<sup>95</sup> La fisiopatologia de la maculopatia diabètica és multifactorial i es relaciona bàsicament amb la hipòxia del teixit adjacent als vasos, la proliferació de diversos factors vasoproliferatius i l'alteració de la permeabilitat de la barrera hematoretiniana (interna i externa), amb el consegüent augment de la permeabilitat vascular ( maculopatia edematosa). En certs casos predominen els fenòmens oclusius vasculars, desencadenant la denominada maculopatia isquèmica. La hialoides posterior, la presència de proliferacions fibrovasculars i el engruiximent de la membrana limitant interna també juguen un paper decisiu en la denominada maculopatia diabètica traccional<sup>96</sup> i, al mateix temps, poden induir la descompensació dels vasos retinians, conduint a una situació d'edema. En el context de una maculopatia diabètica és freqüent la combinació de varis d'aquests factors fisiopatogènics i, per tant, la coexistència d'un component edematós amb un component isquèmic macular, o bé la combinació d'elements traccionals amb la presència d'edema i/o isquèmia macular. Les tres formes més freqüents de maculopatia diabètica: edema macular, maculopatia isquèmica i maculopatia diabètica amb component de tracció de la hialoides posterior

### Edema macular diabètic

Constitueix la principal causa de ceguera en el pacient diabètic, especialment en pacients amb RPDBTP, i consisteix en l'acúmul de fluid en la màcula a partir de capil·lars hiperpermeables de la retina, microaneurismes, anomalies microvasculars intraretinanes o per incompetència del EPR de la BHR. A la exploració clínica amb BMC es detecta un engruiximent retinià amb característiques ben definides. Al inici de la malaltia el EMD pot tractar-se d'una situació reversible, però un cop es cronifica es produeixen canvis retinians degeneratius amb repercussions funcionals irreparables<sup>97,98</sup>. La prevalença del EMD està directament relacionada amb el control, la gravetat i la duració de la malaltia metabòlica, així com la severitat de la retinopatia.

Els factors sistèmics de risc involucrats en el desenvolupament del EMD són: nivells elevats de HbA1c, HTA diastòlica, antecedents de malaltia cardiovascular, anèmia greu (hematòcrit < 40%), dislipèmia, insuficiència renal (IR), embaràs i hàbit tabàquic.

Sol aparèixer abans en els pacients amb DM tipus 2, és a dir, aquells en els que la malaltia s'ha establert de forma tardana, generalment per damunt dels 30 anys. En canvi en els pacients amb DM tipus 1 la incidència de EMD durant els primeres anys de la malaltia és molt escassa<sup>97,98</sup>. L'EM es presenta solament en el 3% dels ulls amb retinopatia diabètica lleu (RDLL), augmentant al 38% en aquells ulls amb retinopatia no proliferativa de moderada a severa i elevant-se al 75% en aquells ulls amb RDP<sup>95</sup>.

Entre els mecanismes responsables de la formació de EMD cal destacar la ruptura de la BHR. Tanmateix, una descompensació en l'equilibri entre el gradient de pressió oncòtica e hidrostàtica en la BHR contribueix al moviment i cúmul de fluid en l'espai extracel·lular. Altres factors implicats en la gènesis del edema són la hipòxia retiniana, la síntesis de factors vasogènics, que augmenten la permeabilitat vascular (VEGF, Interleukina-6, angiotensina II) i les traccions vitreomaculars<sup>99</sup>. La clínica del EMD és molt variada i depèn, en gran part, de la localització del edema. si es tracta d'un edema focal i extrafoveal pot cursar de forma asimptomàtica. en el cas de que el edema afecti al centre de la fòvea, el compromís de la agudeses visual serà major o menor en funció del espessor retinià central i del temps d'evolució del procés. (Figura 15)

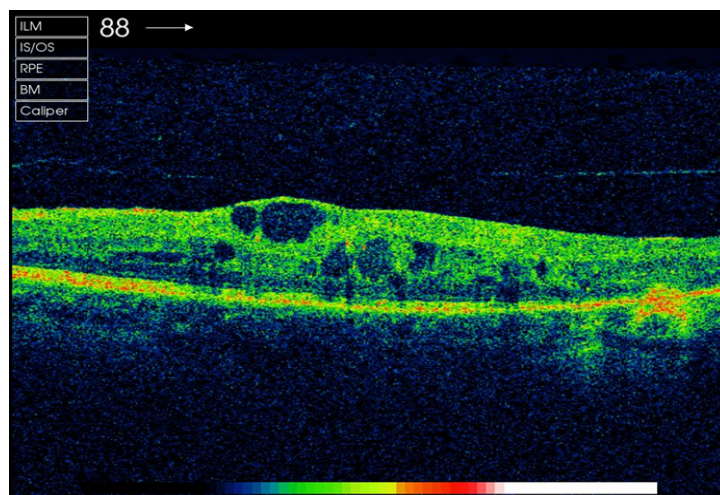


Figura 15. Imatge de OCT amb edema macular diabètic

### Maculopatia isquèmica

Es defineix com una oclusió segmentària dels capil·lars retinians que afecta a la arcada anastomòtica perifoveal en una extensió superior al 25-50%, i que sol cursar amb una gran disminució de la AV<sup>100</sup>. La isquèmia macular es deu principalment a una oclusió dels capil·lars del pol posterior del globus ocular, especialment a nivell de la red capil·lar que delimita la zona ZAF. Es tracta de una d'elles complicacions més greus de la RD, essent tres vegades més prevalent en pacients amb DM tipus 2, i, tot i això, més greu en DM tipus 1, doncs el grau de tancament capil·lar és major en aquests casos<sup>101</sup>. També, menys freqüentment pot ser conseqüència de una oclusió arterial retiniana (de rama o central) o bé per una patologia obstructiva a nivell de la artèria oftàlmica o a nivell de la artèria caròtida interna. L'arcada anastomòtica capil·lar peritoneal, amb el seu ZAF central, correspon a una àrea localitzada en el centre de la màcula de un tamany de unes 500 micres. aquesta zona posseeix la major concentració de fotoreceptors de la retina, predominantment cons, amb la particularitat de que cada FR con li correspon una única fibra nerviosa. Aquesta característica li permet captar la informació referent al color i al contrast de la imatge, a la vegada que la converteix en la regió que proporciona la major agudes visual<sup>100</sup>. La AGF constitueix la prova complementària més sensible per observar amb detall la complexa red vascular perimacular. (Figura 16)

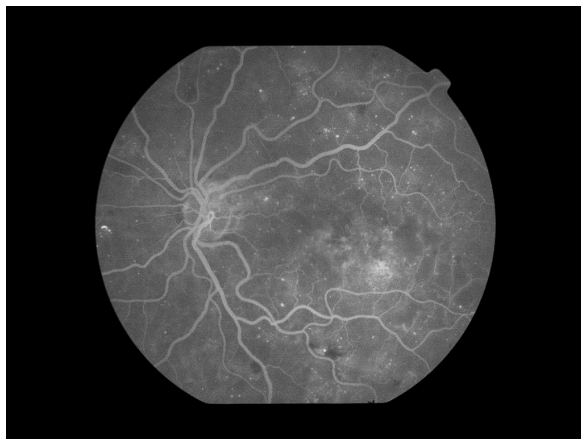


Figura 16. Imatge de AGF que mostra àrees d'isquèmia a la zona macular (zones hipoperfoses)

### Maculopatia traccional

En ocasions el EMD es relaciona amb un factor mecànic de tracció que descompensa la BHR interna (vasos retinians) donant lloc al cúmul de fluid i de material lipídic en la retina.

Una teoria sobre l'origen d'aquestes traccions vitreomaculars postula que aquestes podrien ser secundàries a una alteració de l'estructura del col·lagen vitri, per un fenomen de glicació anòmala secundària a la hiperglucèmia<sup>101,102</sup>. La hialoides posterior tracciona a mode de meseta sobre el pol posterior i produeix una descompensació de la BHR interna. La ecografia i la OCT també poden ser de gran ajuda per confirmar la sospita diagnòstica. (Figura 17)

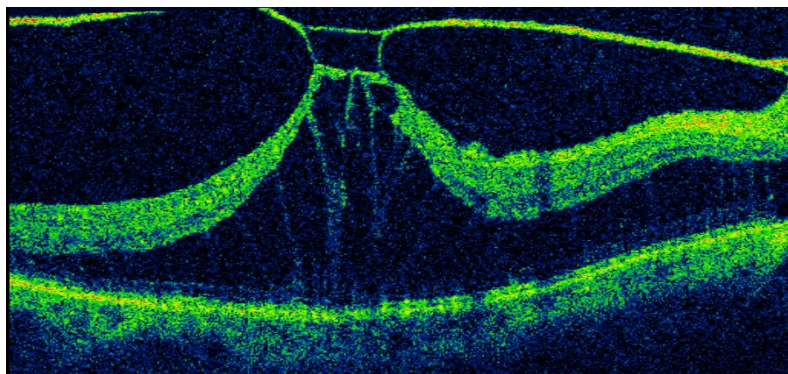


Figura 17. Imatge de OCT que mostra tracció vitreomacular amb engruïment retinià

#### 4. CLASSIFICACIÓ DE LA RETINOPATIA DIABÈTICA

Les tècniques més acceptades per l'exploració y la classificació de la RD són, respectivament, la oftalmoscòpia i la fotografia estereoscòpica (en ella es basa la classificació ETDRS, la més acceptada pels estudis clínics de RD).

El fet que la RD sigui una malaltia progressiva i que els grans estudis multicèntrics nortamericans hagin demostrat que amb el tractament precoç de les formes de risc és possible evitar la progressió cap a la ceguera en més del 90% dels casos, fa imprescindible utilitzar una classificació que permeti detectar fàcilment aquests estadis.

Existeixen varies caseïficacions del EMD en funció de la clínica, de l'aspecte BMC o tomogràfic. La classificació clàssica, que s'usa poc en l'actualitat, distingeix edema macular segons sigui focal o difús<sup>99</sup>. La classificació ETDRS divideix l'edema macular segons la seva aparença a la BMC en clínicament o no clínicament significatiu, i es tracta de una classificació amb finalitat bàsicament encaminada cap a la decisió terapèutica<sup>97</sup>, segons el risc de pèrdua visual moderada.

#### 4.1 Classificació ETDRS

Considerada com patró de referència *gold standard*. Basada en la anàlisi d'imatges estereoscòpiques de 30º realitzades, amb la pupil·la dilatada, en els 7 camps estàndard documentats. L'objectiu fonamental es valorar la gravetat o risc de progressió de cada un dels estadis. L'estadiatge s'estableix en funció del tipus i del número de lesions observades per comparació amb les fotografies estàndard proposades per ETDRS. És la més usada en investigació clínica, però és massa complexa en la pràctica clínica diària. (Taula 3)

ETDRS	AAO (Acadèmia Americana d'Oftalmologia)	
10	No Retinopatia	Absència de lesions
14, 15	No Retinopatia	14= exsudats cotonosos aïllats 15= hemorràgies sense microaneurismes
20, 35	Retinopatia lleu	Microaneurismes, hemorràgies
43	Retinopatia moderada	Hemorràgies (>20 hemos en els 4 quadrants) i, microaneurismes (MA) en els 4 quadrants i anomalies intravasculars retinianes (AMIR) en 3 quadrants
47, 53	Retinopatia severa	Presència de qualsevol de: > 20 hemos en els 4 quadrants 2 rosariament venós AMIR en > 1 quadrant
61, 65	Retinopatia proliferativa	Presència de neovasos

Taula 3. Classificació en la RD recomanada per la AAO, basada en l'estudi ETDRS

#### 4.2 Classificació internacional

Sorgeix per la incomoditat de classificació ETDRS degut a la seva complexitat. Pot ser usada i compresa no només per especialistes en retina, sinó per oftalmòlegs generals i metges d'atenció primària. Pretén simplificar conceptes i millorar la comunicació i l'intercanvi d'informació entre oftalmòlegs i altres especialistes que també tractin a pacients diabètics.

#### 4.3 Classificació "convencional" o modificada de ETDRS

Més completa que la internacional, ja que pot resultar insuficient per a oftalmòlegs en segons quins casos. Classificació per nivells de gravetat clínicament apropiada i suficient, que defineix molt bé els criteris d'inclusió en cada un dels nivells i permet establir un pronòstic i un tractament adequat.

### 5. OPCIONS TERAPÈUTIQUES EN RETINOPATIA DIABÈTICA

#### 5.1 Fotocoagulació làser i crioteràpia

La FCG làser en el pacient diabètic es pot realitzar utilitzant una font d'emissió de làser extraocular o bé una sonda de làser intraocular (làser intraoperatori/endolàser). Les propietats físiques d'aquest làser permeten que aquest interactui precisa i específicament amb els teixits.

Existeixen varies tècniques de FCG macular:

La FCG focal on el tractament es realitza sobre microaneurismes localitzats entre les 500 i 3000 micres dins de la màcula i que són els que ocasionen el EMCS.

La FCG en reixeta el diàmetre d'aplicació és de 100 a 200 micres (l'espai entre impactes ha de ser igual al diàmetre de l'impacte).

La FCG panretinana iniciada en casos de RD amb característiques d'alt risc, on es vol induir una ablació de les àrees d'isquèmia retiana, per evitar la alliberació de substàncies vasoproliferatives, estabilitzar la retinopatia i prevenir la pèrdua greu de visió. Té efectes secundaris i molts cop la AV no millora, però els efectes beneficiosos de la FCG superen els negatius de la mateixa. El diàmetre de la aplicació és de 500 micres i intensitat suficient, s'estén a partir d'elles arcades vasculares, de forma ordenada, cap a la perifèria respectant els vasos, es fan sessions separades en el temps en període de 3-6 setmanes. (**Figura 18**)



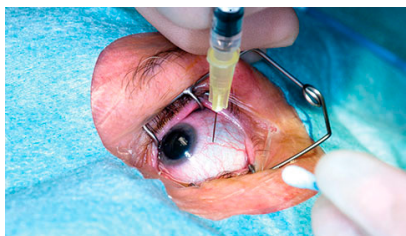
**Figura 18.** Fotocoagulació panretinana en un pacient diabètic

La crioteràpia és un procediment físic capaç d'induir l'ablació del teixit retinià mitjançant l'aplicació de fred transconjuntival o transescleral a través d'un transductor manual connectat a una bomba de nitrogen líquid. El seu ús es restringeix a casos molt concrets, el principal en persistència d'activitat neovascular i/o complicacions en un pacient ja prèviament panfotocoagulat.

## 5.2 Injeccions intravítrees

L'administració de fàrmacs injectats a la cavitat vítria (**Figura 19**) s'utilitza per al tractament de certes malalties que afecten al segment posterior. L'edema macular està considerat com una de les complicacions oculars de la DM de més difícil maneig.

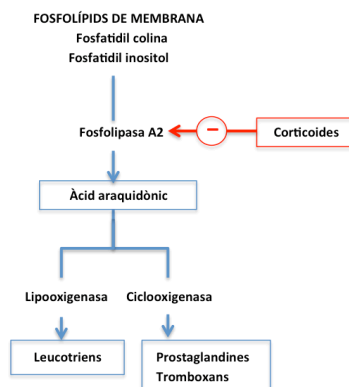
Actualment s'admet que l'EMD es produeix com a conseqüència de una descompensació de la BHR mediada per la PKC i potenciada pel factor de creixement VEGF.



**Figura 19.** Procediment d'injecció intravítrea en condicions d'esterilitat

### Injecció de corticoides

Els corticoides supprimeixen la resposta inflamatòria de forma inespecífica, independentment de quina sigui la naturalesa del estímul inflamatori: inhibeixen l'acció de la fosfolipasa A2, lo qual manté la integritat de la BHR i inhibeixen el gen precursor de VEGF. (**Figura 20**)



**Figura 20.** Mecanisme d'acció dels corticoides. Inhibició de la fosfolipasa A2 i de la formació dels metabòlits de l'àcid araquidònic (leucotriens, prostaglandines i tromboxans), responsables de la inflamació.

### Injecció antiVEGF

El VEGF és un factor pro-angiogènec que juga un paper molt significatiu en la fisiologia de diversos processos, com el desenvolupament de una vascularització correcta en l'embrió i en l'òs. L'activitat del VEGF està relacionada també amb processos angiogènics patològics com la neovascularització coroidea, la retinopatia del prematur i el desenvolupament de tumors. En la RD el VEGF és produït per les cèl·lules del EP, els perícits i les cèl·lules endotelials de la retina en resposta a la hipòxia causada per l'alteració estructural dels capil·lars <sup>103</sup>. És un dels principals mediadors de l'alteració de la BHR i de la producció de la angiogènesis en la retina isquèmica.

Els pacients amb RD tenen nivells més elevats de VEGF intravítrics que pacients normals.

Els ulls amb RD proliferativa, després d'haver sigut vitrectomitats, continuen mantenint nivells alts de VEGF intravítrics, i aquests nivells són superiors als trobats en el plasma, lo que suggereix una secreció mantinguda local de VEGF post vitrectomia por RDP <sup>104</sup>. De manera que la inhibició de la activitat VEGF és un pas important en la prevenció i el tractament de les diverses alteracions que se succeeixen en el desenvolupament del dany microvascular diabètic

### **5.3 Cirurgia vitreoretinana**

L'objectiu fonamental d'una vitrectomia és la desaparició d'una hemorràgia vítria, reposicionant la retina i evitant la progressió de la retinopatia en remoure la hialoides posterior del vitri, que serveix de sustentació dels neovasos i possibilitant la contracció del teixit fibrovascular

que causa el despreniment traccional de la retina. Això facilita el tractament amb làser, que s'estabilitzarà finalment la retinopatia en molts casos.

Les indicacions d'una vitrectomia en RD són:

1. Hemorràgia vítria severa sense tendència a reabsorció, i es recomana una vitrectomia precoç amb endofotocoagulació en pacients sense tractament previ amb làser, en pacients que hagin perdut la visió de l'altre ull, en diabètics tipus 1 i rubeosis de l'iris.
2. RDP activa, que persisteix malgrat una panfotocoagulació completa.
3. Hemorràgia pre-retiniana o vítria parcial no permet realitzar una fotocoagulació eficaç.
4. Despreniment traccional de retina amb compromís macular.
5. Despreniment de retina mixt traccional / regmatògen
6. Pacient amb EMD i tracció vitreoretinal significativa

La vitrectomia en casos de bon pronòstic, sense compromís macular, és una de les intervencions amb major efectivitat per recuperar la visió en una ceguesa associada a retinopatia diabètica, podent aconseguir una visió millor de 20/100 en prop del 80% dels casos, tot i que aquest resultat funcional depèn de la circulació retiniana i de l'estat anatòmic de l'ull preoperatori. És condicions favorables més del 90% dels casos estableixen la seva retinopatia.

## 6. MANEIG DE LA RETINOPATIA DIABÈTICA

### 6.1 Establiment de la primera exploració oftàlmica

DM tipus 1: la primera revisió oftàlmica es farà als 3-5 anys del diagnòstic de la DM. En cas de presentar-se algun signe de RD s'aconsella mantenir el control ocular en els centres hospitalaris, en base al alt grau de complicacions i caràcter agressiu de les mateixes.

DM tipus 2: la primera revisió es farà en el moment del diagnòstic aconsellant controls anuals o bianuals posteriors si no hi ha factors de risc associats fins l'aparició d'algun grau de retinopatia. En detectar aquesta, els criteris clínics són exposats segons el grau d'afectació, l'existència o no d'edema, i/o la presència de complicacions secundàries a una retinopatia avançada. S'ha de prestar especial atenció a aquells pacients diabètics tipus 2 d'aparició primerenca, i més concretament entre els 30 i 50 anys, a causa de la seva major expectativa de

vida i un control metabòlic habitualment inadequat, així com aquells en tractament amb insulina ja que, en relació amb les complicacions, es poden comportar com diabètics tipus 1<sup>105</sup>.

## 6.2 Seguiment

Per establir la freqüència de les revisions posteriors es tindrà en compte, d'una banda, el grau de retinopatia i, d'altra, l'estat de la màcula. Pel que fa a la periodicitat de les revisions primarà el criteri de major risc visual. Per exemple si un pacient amb RPDBTLL, el control aconsellat és anual, presenta també un EMDBT clínicament significatiu associat, la periodicitat de les visites les ha de dictar aquest últim (cada 3 mesos).

En tots els estadis de la RPDBT és essencial el control endocrinològic fonamentalment de: glucèmia, hemoglobina glicosilada, microalbuminúria en orina, hipertensió arterial (HTA), sobrepès, lípids, estat cardíac i renal. Això té conseqüències en dos sentits, d'una banda si existeix un trastorn metabòlic important el nostre control ocular haurà de ser més freqüent i, d'altra banda, podem posposar el tractament ocular, per exemple d'un edema macular, fins que s'aconsegueixin nivells acceptables de glucèmia i/o TA en alguns casos. Així mateix es recomanarà al pacient deixar de fumar.

## 6.3 Sense RD aparent

Examen oftàlmic bianual si hi ha bon control metabòlic (Hba1c <7%) i absència de factors de risc associats (HTA, dislipèmies, etc.). En aquests casos l'exploració oftàlmica bianual<sup>106</sup> sembla ser suficient per detectar a temps tant l'edema macular com la RD proliferativa. Això reduiria el nombre de primeres visites a l'oftalmòleg en un 25% la qual cosa disminuiria considerablement els costos sanitaris i evitaria al diabètic algunes exploracions innecessàries.

Exploracions oftalmològiques anuals si hi ha factors de risc associats o el control metabòlic és dubtós o deficient.

## 6.4 Amb RD lleu

Control oftalmològic anual. Avançar el control en cas de: gran quantitat de MA o que aquests amenacin fòvea, primera exploració d'un pacient mal controlat, pas recent d'antidiabètics orals a insulina, pacients embarassades (es farà un control a cada trimestre i després cada 6 mesos durant el primer any després del part). En aquest estadi és fonamental informar i conscienciar el

pacient sobre la importància del control metabòlic. Segons el DCCT<sup>107-110</sup> en els diabètics tipus 1 que mantenen un nivell mitjà d'HbA1c del 7,2% es redueix la incidència de la retinopatia en un 76% i la progressió de la retinopatia diabètica en un 54%. El UKPDS<sup>111</sup> va constatar troballes similars en els diabètics tipus 2. A més va demostrar que el control estricte de la tensió arterial disminueix la progressió de la RD en un 34% i el deteriorament de l'agudesesa visual en un 47%<sup>112</sup>.

### **6.5 Amb RD moderada (RDM)**

Control oftalmològic semestral.

No precisa AFG. No precisa PFCG atès que el risc de progressió a l'any a RD proliferativa oscil·la entre 1-8%.

### **6.6 Amb RD severa**

Les RD no proliferativa severa són casos que han de ser analitzats amb cautela, atesa la probabilitat de progressió a RPDBT proliferativa que se situa al voltant del 50,2% en un any (un 14,6% 21 amb característiques d'alt risc).

- DM 2: control hospitalari cada 3-4 mesos.
- DM 1 amb mal control metabòlic: revisió hospitalària cada 2 mesos.

Considerar PFCG primerenca en aquells pacients amb major risc de progressar: DM 2 amb mal control metabòlic, pacients que no compleixen les revisions de forma habitual, RDP en l'altre ull, pacients amb cataractes amb significació visual evident que pugui limitar en un futur pròxim la PFCG, previ a la cirurgia de cataracta, embaràs o intenció d'aconseguir àrees d'isquèmia angiogràfica generalitzades.

En aquests casos l'ordre de fotocoagulació que s'aconsella és realitzar un quadrant per sessió començant pel nasal o l'inferior i finalitzant pel temporal. Pel que fa a la freqüència, es donarà una sessió cada 2-3 setmanes (si es pot esperar, millor cada 3 setmanes) ja que la màcula no es recupera en 1 sola setmana. Abans de començar la fotocoagulació s'ha de tenir en compte els diferents graus de magnificació de les diferents lents disponibles.

Hi ha alguns treballs que proposen l'ús d'anti-VEGF com a coadjuvants de la panfotocoagulació, en un intent per minimitzar l'edema macular post-làser<sup>113-115</sup>.

És important emfatitzar que en els casos amb RPDBT severa que hàgim decidit fer una PFCG i que a més presentin edema macular clínicament significatiu es tractarà primer aquest i posteriorment es farà la PFCG.

## 7. MANEIG DEL EDEMA MACULAR

### 7.1 Edema macular clínicament significatiu (EMCS) focal o multifocal

El tractament d'elecció d'aquest tipus d'edema continua sent la fotocoagulació focal. Ofereix bons resultats a llarg termini i està considerat com el tractament de referència

El tractament es realitzarà sobre els microaneurismes que s'escapoleixin i estiguin situats al centre de les corones circinades, entre 500 i 3.000 micres del centre de la ZAF, amb espot de 50-100 micres i potència suficient per aconseguir un blanqueig suau dels mateixos. En aquells edemes, generalment ja de tipus mixt (i no purament focals), en els quals l'engrossiment macular central dificulti la laserteràpia (que sol correspondre a valors de OCT superiors a 400 $\mu$ ) podria considerar-se teràpia antiangiogènica o corticoteràpia intravítrea seguida de làser.<sup>116-120</sup> Aquest tema es discuteix més àmpliament en l'edema macular clínicament significatiu (EMCS) difús. En cas que s'objectivi tracció vítreomacular es procediria a cirurgia vitreoretinana (CVR)<sup>121-123</sup> amb o sense dissecció de MLI<sup>124-126</sup> i/o triamcinolona intravítrea/antiVEGF intravítres. Si es produeix una millora estable el pacient passa a control pel seu oftalmòleg.

### 7.2. EMCS difús

Quan hi ha un EMCS difús amb tracció vitreoretiniana la indicació terapèutica és la CVR amb hialodectomia, sent discutida la dissecció de la membrana limitant interna<sup>127-131</sup>, així com l'ús al final de la cirurgia de corticoides intravítres i/o anti-VEGF<sup>132-134</sup>.

Si no hi ha tracció, l'opció actualment en vigor i que forma part dels protocols establerts, és l'aplicació de làser en reixeta modificada. En aquesta última es fan servir cremades menys intenses (gris suau) i més petites (50  $\mu$ ) i es tracta els microaneurismes de forma directa però sense intentar aconseguir el canvi de coloració dels mateixos. A més tracta zones de engruiment retinià i àrees de no perfusió que es creen en relació amb l'edema. El mapa de OCT és útil per identificar les

zones d'engruiximent retinal. D'acord amb els criteris del ETDRS el tractament ha de repetir-se als 3-4mesos si l'edema no s'ha resolt (màxim 3 tractaments).

Els resultats que s'obtenen amb aquesta tècnica són inferiors als de l'edema macular focal. Només s'evita la pèrdua moderada (pèrdua igual o major a 15 lletres del ETRDS) d'agudes visual en un 50% dels pacients, un 26% continua perdent visió a llarg termini i només un 3% experimenta una lleu millora en la seva agudes visual. Entre les alternatives farmacològiques proposades per al control de l'edema macular difús hi ha l'ús de corticoides intravitris, concretament triamcinolona intravitries (TAIV) i els nous fàrmacs anti-VEGF (afilbercept). Les complicacions descrites amb l'ús de la triamcinolona intravitria<sup>134-137</sup> (glaucoma, DR, cataractes, endoftalmitis, etc) i els problemes legals que poden derivar del seu ús fan que cada vegada siguem més restrictius pel que fa a la selecció del pacient. En EMCS difusos amb gran engrossiment macular central, la seva eficàcia el converteix en el fàrmac més recomanable. La opció més estesa és l'ús de 4 mg de TAIV en pacients no vitrectomitzats i 8 mg en els vitrectomitzats<sup>138</sup>. En casos en què aquest engrossiment macular central no sigui tan marcat ens inclinarem pels antiVEGF (afilbercept, rabizumab, bevacizumab) els efectes secundaris no semblen ser tan importants tants. Atès que s'ha vist que l'efecte de la TAIV és transitori<sup>139-141</sup> s'ha plantejat la possibilitat d'iniciar el tractament amb una injecció de TAIV i continuar amb un antiVEGF i/o amb laserteràpia. Si després de les teràpies proposades no s'obtingués una millora, les opcions terapèutiques són reduïdes i només en casos molt seleccionats es realitzarà CVR<sup>142-145</sup>.

### 7.3 Edema macular quíctic

Davant d'un edema macular quíctic amb tracció vitreomacular es proposa CRV sense dissecció de la membrana limitant interna (MLI) en aquells casos en què es desconeixi el temps d'evolució o que aquest sigui superior a 6 mesos (pel risc a induir un forat macular). En casos que sigui inferior a 6 mesos podria realitzar-se la dissecció de la MLI. En els pacients afectes de EMQ en què no hi hagi evidència de tracció l'opció que se'ns planteja és l'ús de TAIV seguit, de forma opcional, de antiVEGF i/o reixa modificada<sup>146-148</sup>.

A manera de resum remarcar que en presència d'un component traccional, amb repercussió funcional, en qualsevol tipus d'edema macular diabètic, valorarem la indicació de CRV.

## 7.4 Edema macular isquèmic

La isquèmia macular ve definida per signes clínics com:

- Increment de la zona avascular foveal (ZAF)  $\geq 1.000 \mu$ .
- Ruptura de l'anell capil·lar perifoveal a la vora de ZAF.
- Àrea de perfusió dins de un diàmetre de disc del centre de la fòvea.

En l'EMD de predomini isquèmic amb tracció es planteja la possibilitat d'una cirurgia de retina i vitri. Si no hi ha tracció el pronòstic és ombrívol. L'ús d'anti-VEGF està inicialment contraindicat, ja que tot i que s'aconsegueix un descens dels edemes maculars, l'agudesesa visual empitjora per l'increment de la isquèmia<sup>149</sup>.

## 7.5 Dipòsit lipídic massiu

En alguns pacients amb edema macular crònic els dipòsits lipídics es concentren en àrea macular danyant de forma irreversible els fotoreceptors fent, per això, ineficaç qualsevol tractament.

## 8. LA INFLAMACIÓ I L'ESTRÈS OXIDATIU

Com ja em comentat en apartats anteriors, l'estrès oxidatiu es postula com annex d'unió entre els mecanismes bioquímics responsables del inici i perpetuació de les alteracions vasculars que donen lloc a les complicacions microvasculars de la RD.

La DM forma part de les malalties no transmissibles (MNT) que són, per definició, aquelles malalties cròniques que no són infeccioses i no transmissibles. Són de llarga durada i de progressió generalment lenta. Les MNT més comuns són, a part de la diabetis, el càncer, les malalties cardiovasculars, les malalties respiratòries cròniques i les malalties neurològiques, i totes elles són la causa més freqüent de mort i discapacitat en el món modern. Les MNT comparteixen mecanismes moleculars comuns que tenen un paper important en el seu inici i desenvolupament. Aquests mecanismes inclouen l'estrès oxidatiu, la inflamació i les alteracions mitocondrials<sup>150-155</sup>.

El terme "estrès oxidatiu" va començar a utilitzar-se amb freqüència en la dècada de 1970, però els seus orígens conceptuals es remunten als anys cinquanta dels investigadors que reflexionen sobre els efectes tòxics de la radiació ionitzant, els radicals lliures i els efectes tòxics similars de l'oxigen molecular i l'aportació potencial d'aquests processos al fenomen de l'envelliment<sup>156</sup>. En general, l'estrès oxidatiu es considera com a conseqüència d'un desequilibri entre espècies antioxidants i pro-oxidants, que sovint generen danys indiscriminats i globals a l'organisme<sup>157,158</sup>. Les persones grans són més susceptibles a l'estrès oxidatiu i aquest fenomen depèn, gairebé en part, d'un deteriorament en el rendiment dels seus sistemes antioxidants endògens<sup>159,160</sup>.

Les espècies reactives d'oxigen (ROS) comprenen espècies no radicals com el peròxid d'hidrogen ( $H_2O_2$ ) i espècies de radicals lliures com el superòxid ( $O_2^{\cdot-}$ )<sup>161</sup>. Aquestes molècules, produïdes de manera persistent a la cèl·lula, participen en esdeveniments fisiològics com la defensa immune primària, la diferenciació cel·lular i la senyalització<sup>162-164</sup>. De fet, alguns ROS com  $H_2O_2$  són jugadors versàtils de la maquinària de senyalització molecular perquè són petits, molt difusibles, i es poden generar i degradar ràpidament<sup>165</sup>. D'altra banda, els ROS poden oxidar diferents biomolècules a la cèl·lula, donant lloc a una seqüència de reaccions en cadena que pot arribar a causar danys moleculars i cel·lulars<sup>164-166</sup>.

La lesió de l'àcid desoxiribonucleic (ADN) més àmpliament estudiada produïda per l'estrès oxidatiu és la formació de 8-oxo-2'-deoxyguanosine (8-oxo-dG). La modificació permanent del material genètic resultant d'aquest dany oxidatiu representa el primer pas en la mutagènesi, la carcinogènesi i l'envelliment.

Les espècies reactives al oxigen no només produeix lesió en l'ADN, sinó també en altres components cel·lulars que contenen residus d'àcids grassos poliinsaturats de fosfolípids, que són extremadament sensibles a l'oxidació. Els principals productes de peroxidació lipídica són malondialdehid (MDA) i 4-hidroxi-2-nonenal (HNE). L'MDA és mutagènic en cèl·lules bacterianes i de mamífers i carcinogènic en rates, i HNE és feblement mutagènic, però sembla ser el principal producte tòxic de peroxidació de lípids<sup>167,168</sup>. La peroxidació de lípids s'utilitza com a indicador d'estrès oxidatiu a les cèl·lules i els teixits. D'altra banda, les proteïnes també són objectius de les modificacions oxidatives a les cèl·lules. Les proteïnes oxidades s'acumulen en condicions

específiques (és a dir, envelliment) i la seva acumulació depèn de l'equilibri entre la seva generació i la seva eliminació per degradació de proteïnes o vies de reparació. Les proteïnes oxidades sovint perden la seva funció bioquímica amb efectes descendents en diversos processos cel·lulars. Certs processos d'oxidació són reversibles i, per tant, els productes d'aminoàcids oxidats es poden reduir al seu aminoàcid inicial. Els productes d'oxidació irreversibles es refereixen principalment als derivats d'aminoàcids hidroxilats i carbonilats <sup>169</sup>.

L'equilibri entre els efectes beneficiosos i perjudicials de ROS es conserva a la cèl·lula per l'activitat d'una sèrie complexa de mecanismes de desintoxicació no enzimàtics i enzimàtics coneguts col·lectivament com antioxidants <sup>170,171</sup>.

## 8.1 Sistemes antioxidants enzimàtics

### Superòxid dismutasa (SOD)

Es tracta d'un enzim que catalitza la dismutació de l'anió superòxid al peròxid d'hidrogen, que després es descomposa per catalases localitzades principalment en els peroxisomes <sup>172</sup>. Es coneixen dues formes de SOD (SOD-1 i SOD-2). El SOD-1 conté coure i zinc i també es coneix com Cu-ZnSOD. Aquest enzim és primari situat al citosol, però també al nucli, i és una proteïna homodimèrica. El coure és essencial per a la reacció catalítica, mentre que el zinc és important per mantenir l'estructura de la proteïna. El SOD-2, també conegut com a superòxid dismutasa dependent de manganès, es troba a la matriu mitocondrial <sup>173</sup>.

### Catalasa:

Es troba al fetge, els eritròcits, els ronyons i el sistema nerviós central. La principal funció d'aquest enzim és convertir  $H_2O_2$  a aigua i oxigen molecular.

### Glutatió peroxidasa

És un enzim important en els sistemes de defensa antioxidant cel·lular, peròxids i hidroperòxids de desintoxicació. La seva funció és reduir l'aigua a  $H_2O_2$ , oxidant dues molècules de glutatió (GSH) a glutatió disulfur (GSSG), que es converteix de nou a GSH per l'enzim, glutatió reductasa usant NADPH <sup>174</sup>.

## Paraoxonases (PON)

És una família de tres enzims anomenats PON1, PON2 i PON3. Tenen funcions multifuncionals en diverses vies bioquímiques com la protecció contra el dany oxidatiu i la peroxidació de lípids, la contribució a la immunitat innata, la desintoxicació de les molècules reactives, la bioactivació de fàrmacs, la modulació de l'estrès del reticle endoplasmàtic (ER) i la regulació de la proliferació cel·lular / apoptosi<sup>175</sup>.

### **8.2 Sistemes antioxidants no enzimàtics**

Els compostos antioxidants com l'àcid ascòrbic (vitamina C), l' $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), el glutatió (GSH), els carotenoides, els flavonoides, els polifenols i altres, tenen un paper important en els sistemes de defensa antioxidants.

### **8.3 Relació entre l'estrès oxidatiu i la inflamació**

Quan l'equilibri entre l'estrès oxidatiu i els antioxidants s'altera a les cèl·lules dels teixits i els òrgans, promou una resposta inflamatòria que juga un paper vital en la defensa de l'hoste.

La inflamació és una resposta adaptativa del sistema immune innat que es desencadena mitjançant estímuls i lesions, com ara infecció i lesió tissular<sup>176, 177</sup>. En general, és un procés controlat amb l'objectiu de restaurar l'homeòstasi, però en ocasions condueix al dany tissular, la fibrosi i les pèrdues de la funció cel·lular.

En poques paraules, la resposta inflamatòria a la infecció o la lesió del teixit produeix un alliberament coordinat de leucòcits al lloc d'infecció o lesió<sup>178,179</sup>. Aquest fenomen està ben caracteritzat en les infeccions microbianes, on els receptors dels macròfags i mastòcits residents en teixits, com ara els receptors tipus proteïna de domini d'oligomerització (NOD) i receptors tipus TLR, desencadenen a la producció i l'alliberament d'una varietat de mediadors inflamatoris, com ara citocines, quimiocines, eicosanoides, amines vasoactives i productes de cascades proteolítiques. L'efecte principal d'aquests mediadors és un accés obert als vasos sanguinis, a través de les vènules postcapilars. Un cop fet això, l'endoteli dels vasos sanguinis s'activa i condueix a l'extracció selectiva de neutròfils a través de la unió de selectes de cèl·lules endotelials amb integrines i receptors de quimiocines en leucòcits, que ocorre tant a la superfície

endotelial com a l'extravasular<sup>180</sup>.

Una vegada que els neutròfils van al lloc afectat, s'activen, ja sigui per contacte directe amb agents patògens o per mitjà de les citoquines segregades per cèl·lules residents en teixits. Els neutròfils intenten eliminar els agents invasors per alliberament dels continguts tòxics dels seus grànuls, que inclouen ROS i espècies reactives de nitrogen, catepsina G, proteïna 3 i elastasa<sup>181</sup>. Aquesta acció no discrimina entre els objectius microbiològics i amfitrions, de manera que el dany colateral als teixits hostils és inevitable

Una resposta inflamatòria aguda positiva provoca l'eliminació dels patògens seguida d'una fase de resolució i reparació, que està mediada principalment per macròfags reclutats i residuals per teixits. En aquesta situació, les prostaglandines pro-inflamatòries canvien als mediadors lipídics (lipoxines, protectines i resolvins), que són antiinflamatoris. Aquesta transició és crucial per a la resolució de la inflamació. La contractació de neutròfils està inhibida per les lipoxines i, a més, promou la contractació de monòcits, que eliminen les cèl·lules mortes i inicien la remodelació dels teixits. Les proteïnes, les resolucions, els factors de creixement, el factor de creixement transformador- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) són produïts pels macròfags i també tenen un paper important en la resolució de la inflamació, inclosa la iniciació de la reparació dels teixits<sup>182</sup>.

Si la resposta inflamatòria aguda no es resol, el procés inflamatori persisteix i adquireix noves característiques. Els macròfags i les cèl·lules T tracten de restablir l'homeòstasi i si el resultat d'aquesta combinació no és suficient, es produeix un estat inflamatori crònic que condueix a la formació de granulomes i teixits limfòcits terciaris<sup>183</sup>.

## 9. LES PARAOXONASES

Hi ha evidències que relacionen la inflamació crònica i la desregulació de l'estrès oxidatiu com a principals signes fisiopatològics de la diabetis, el càncer, les malalties cardiovasculars, les malalties respiratòries cròniques i les malalties neurològiques.

La família de les paraoxonases que ja em parlat, està formada per tres membres anomenats PON1, PON2 i PON3. Estan implicats en diverses vies bioquímiques com la protecció contra el dany oxidatiu i la peroxidació de lípids, la contribució a la immunitat innata, la bioactivació de fàrmacs, la desintoxicació de les molècules reactives, la modulació de l'estrès

oxidatiu en el reticle endoplasmàtic i la regulació de la proliferació cel·lular / apoptosi <sup>174</sup>. Els gens PON es localitzen al costat del braç llarg del cromosoma 7 (7q21.3-q22.1) en humans i el cromosoma 6 en ratolins <sup>184,185</sup>. PON1 va ser el primer enzim identificat de la família. El 1953, Aldridge avaluava les taxes d'hidròlisi d'insecticides organofosforats en diferents teixits de conills i rates i va observar que un dels insecticides organofosforats, presentava una elevada taxa de degradació en el sèrum dels conills i que aquest compost es va escindir per una esterasa. Les esterases es van classificar depenent de la seva capacitat d'hidròlisi en A-esterasa (substrats hidrolitzats) i B-esterases (inhibida per la interacció amb substrats) <sup>186,187</sup>. El nom de les paraoxonases prové de la capacitat PON1 del paraoxon hidrolitzat, el metabòlit tòxic del paratio. Uns anys després, es van identificar els altres dos membres de la família i, en conseqüència, es van denominar PON2 i PON3 <sup>188</sup>. Els gens PON1 i PON3 s'expressen en la majoria dels teixits, i els seus productes proteics es troben en circulació lligats a lipoproteïnes d'alta densitat (HDL) <sup>189-191</sup>. Contràriament, la proteïna PON2 és un enzim intracel·lular que no es troba al plasma <sup>192</sup>.

## 9.1 Paraoxonasa 1

Inicialment, PON1 va ser estudiada per la seva capacitat d'hidrolitzar compostos organofosforats i, per tant, pel seu paper protector contra l'enverinament per derivats organofosforats <sup>184,185</sup>. El paper fisiològic de PON1 està relacionat amb la seva capacitat per hidrolitzar els peròxids lipídics i s'observen alteracions en l'activitat PON1 sèrica en malalties que impliquen estrès oxidatiu (protegeix contra l'oxidació) <sup>193</sup>, inflamació (PON1 com a fase de fase aguda negativa) <sup>194</sup> i malalties del fetge (sintetitzades en aquest òrgan) <sup>195</sup>. L'enzim és una esterasa dependent del calci, el seu pes molecular és de 43 a 45 kDa i es compon de 354 aminoàcids.

PON1 es considera una enzima "promiscua" a causa de la capacitat d'hidrolitzar molts altres substrats, com ara altres compostos organofosforats, ariléster no fòsfor i també lactones; aquest últim es considera com el seu substrat principal. Per tant, PON1 pot ser avaluat per les seves diferents activitats:

- Activitat de la paraoxonasa: l'enzim hidrolitza compostos organofosforats com el paraoxon, la soma, la sarina i altres.
- Activitat de la lactona: PON1 hidrolitza lactones aromàtiques i alifàtiques com la 5-tiobutil

butirolactona (TBBL) o altres lactones com la dihidrocoumarina.

- Activitat d'arilesterasa: quan el substrat es hidrolitza és un éster aromàtic com acetat de fenil o acetato de 4 (p) -nitrofenil <sup>196</sup>.

Durant molt de temps, ha existit certa confusió respecte a l'estructura i mecanisme d'acció d'aquest enzim, ja que la seva depuració és inestable i sovint contaminada. Harel et al. <sup>197</sup> va descriure l'estructura de PON1 a través de la metodologia d'evolució dirigida i va proposar que PON1 sigui una hèlix  $\beta$  de sis branques amb un lloc actiu únic que també és important en l'enllaç HDL. En poques paraules, la metodologia d'evolució dirigida per replicar el procés evolutiu al laboratori induint artificialment mutacions en el gen d'interès, seguit per la selecció i amplificació de les variants que mostren una millora de les característiques desitjades

A causa de la seva capacitat per hidrolitzar una àmplia gamma de substrats, es va realitzar una investigació per distingir la funció nativa o "ancestral" d'aquest enzim. Un cop més, els estudis d'evolució dirigits, juntament amb estudis d'estructura-funció, van identificar la funció primordial de PON1 com la de una lipolactonasa <sup>198-201</sup>, que posteriorment va evolucionar a noves especificitats del substrat. Les lactones són de naturalesa omnipresent i es produeixen en els cinc regnes (Monera, Protista, Plantae, Fongs i Animalia) <sup>202</sup>. Mostren una àmplia diversitat filogenètica i tenen la capacitat d'afectar la senyalització, creixement i diferenciació cel·lular. Les lactones endògenes i exògenes es metabolitzen mitjançant lactonases, aleshores alterant la seva activitat biològica i/o distribució <sup>203</sup>. En conseqüència, és probable que la lactonasa sigui l'activitat primària de PON1, mentre que l'activitat de la paraoxonasa es va produir com una activitat promiscua durant la seva evolució.

Les tres activitats, la paraoxonasa, la lactosa i l'arilesterasa, comparteixen el mateix lloc actiu; no obstant això, diferents residus al lloc actiu participen en les seves activitats <sup>194</sup>. Per exemple, els residus His115-His134 estan implicats en l'activitat catalítica de la lactonasa i l'arilesterasa, i les mutacions en un dels dos residus disminueixen o suprimeixen dràsticament les dues activitats. Rosenblat et al. <sup>203</sup> va informar que, a més de la seva capacitat per degradar els peròxids lipídics, PON1 també augmenta l'efluent de colesterol dels macròfags, que poden contribuir a contribuir amb els efectes antiteratogènics de PON1.

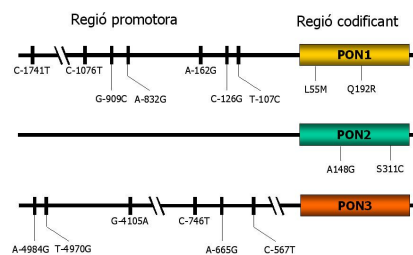
## Polimorfisme Paraoxonasa 1

La capacitat per hidrolitzar el substrat paraoxó, es va utilitzar als anys seixanta del segle passat, com a mètode per mesurar l'activitat PON1 en molts teixits i espècies. Així és com es va fer palesa l'existència d'una variabilitat considerable en l'activitat PON1 entre individus. Playfer et al.<sup>204</sup> va ser el primer en investigar les variants genètiques de l'enzim, arribant a la conclusió que la variabilitat en l'activitat PON1 observada era determinada per un mateix locus autosòmic amb dos possibles al·lels. Si es representaven els valors en histogrames, aquests suggerien la presència de dos o tres fenotips diferents corresponents a activitats PON1 altes, mitjanes i baixes en sèrum. A més, el fenotip d'activitats PON1 baixes presentava variacions depenent de l'origen geogràfic/ètnic de la població<sup>205</sup>. Posteriorment, Eckerson et al. van estudiar aquestes tres variants fenotípiques<sup>206,207</sup>. Al representar els valors d'activitat PON1 mitjançant dos substrats diferents, i utilitzant sal, es resolien millor els polimorfismes fenotípics. A les variants amb baixa activitat les va anomenar AA; AB a les intermitges; i BB a les altes (actualment anomenades QQ, QR i RR, respectivament).

Adkins et al, 10 anys més tard, van identificar dues posicions polimòrfiques a la regió codificant de PON1: Arg/Gln a la posició 192 (polimorfisme PON1<sub>192</sub>, amb dos al·lels anomenats R i Q); i Leu/Met a la posició 55 (PON1<sub>55</sub> amb dos al·lels anomenats L i M)<sup>208</sup>. Dels dos, el PON1<sub>192</sub> correlacionava amb els fenotips AB descrits anteriorment, essent el més estudiat ja que els dos al·loenzims tenen diferents afinitats i activitats catalítiques en una sèrie de substrats. En el cas del substrat paraoxó, l'al·loenzim R té una capacitat més gran d'hidròlisi que l'al·loenzim Q. El polimorfisme PON1<sub>155</sub>, en canvi, no afecta la interacció de PON1 amb els substrats, tot i que l'al·loenzim M s'ha associat a una activitat i concentració de l'enzim en sèrum més baixa<sup>209</sup>. De polimorfismes se n'han trobat també a la regió promotora del gen, concretament fins a set<sup>210-212</sup>.

### **(Figura 21)**

D'aquests, el polimorfisme PON1<sub>197</sub> és el determinant genètic dels nivells de PON1 més important, ja que sembla afectar a la concentració de l'enzim i, en conseqüència, a la seva activitat. A més, s'ha vist que es troba en desequilibri de lligament amb el polimorfisme PON1<sub>55</sub>.



**Figura 21.** Representació esquemàtica dels polimorfismes més prevalents a la societat de PON1, PON 2 i PON3

Els 2 polimorfismes de la regió codificant s'han associat a diverses condicions fisiopatològiques. El polimorfisme PON1<sub>192</sub> s'ha associat amb malaltia de les artèries coronàries (CHD), infart, hipercolesterolèmia familiar, diabetis tipus 2, i la malaltia de Parkinson. El polimorfisme PON1<sub>55</sub> ha estat associat amb infart, CHD, malaltia de Parkinson, i amb variacions en les concentracions de colesterol LDL, PON1 i activitat contra paraoxó<sup>213</sup>.

Tot i això, independentment del genotip de PON1, s'han associat valors baixos d'activitat PON1 a diabetis de tipus 1, hiperlipèmia, CHD, insuficiència renal crònica, síndrome metabòlica, artritis reumatoide, disfunció tiroïdal, i urèmia<sup>213</sup>. De fet, molts estudis suggereixen que el fenotip de PON1 (activitat) podria ser més important que el genotip<sup>214</sup>.

### Determinants de l'activitat paraoxonasa en sèrum

L'activitat o concentració de PON1 en sèrum varia notablement, tant en població general com en pacients afectats per diferents malalties. Aquest fet dificulta notablement la interpretació clínica dels resultats. Ja hem vist que els polimorfismes del gen de PON1 són els responsables de bona part d'aquesta variació, però s'ha vist que factors ambientals, nutricionals i l'estil de vida també poden contribuir a aquestes variacions.

L'efecte de la dieta ha estat investigat per diversos estudis d'intervenció i poblacionals. Així com en ratolins o conills l'administració d'una dieta pro-aterogènica va provocar una disminució en l'activitat i/o concentració PON1, que van correlacionar amb una disminució del colesterol HDL<sup>215,216</sup>, en humans l'efecte d'una dieta occidental ha estat menys estudiat. Alguns estudis evidencien que qualsevol dieta rica en greixos i poc saludable provocarà una disminució important

en l'activitat PON1<sup>217</sup>. Per altra banda, s'ha descrit que el consum de sucs de magrana<sup>218</sup> i el consum moderat d'alcohol<sup>219</sup> poden augmentar l'activitat PON1. Tot i això, estudis poblacionals no han trobat associacions clares entre factors nutricionals i activitat PON1<sup>220</sup>.

L'extracte de fum de tabac inhibeix l'activitat PON1 *in vitro*<sup>221</sup>, suggerint que fumar pot ser perjudicial per l'activitat de l'enzim *in vivo*. James et al.<sup>222</sup> van demostrar una associació entre l'hàbit de fumar i la disminució de l'activitat PON1. L'activitat de l'enzim en ex-fumadors és comparable a la dels no-fumadors, indicant que l'efecte del tabac és reversible. Curiosament, els nivells de PON1 s'igualen als dels no-fumadors quan els fumadors beuen moderadament<sup>223</sup> o practiquen exercici regularment<sup>224</sup>.

Molts estudis han demostrat que l'activitat PON1 disminueix amb l'edat<sup>217</sup>. Això correlaciona amb un augment de la susceptibilitat de l'HDL a oxidar-se en la senescència<sup>225</sup>. Sembla que el polimorfisme PON1<sub>192</sub> podria jugar un paper en aquesta pèrdua d'activitat, ja que els homozigots QQ mostren una major pèrdua d'activitat amb l'edat<sup>226</sup>.

L'exposició a toxines o fàrmacs també afecten l'activitat de l'enzim. Hi ha estudis que demostren que els individus exposats a organofosforats tenen una disminució temporal de l'activitat PON1<sup>217</sup>. El tractament farmacològic amb simvastatina o estrògens augmenten l'activitat PON1<sup>227,228</sup>.

### Síntesi de PON1

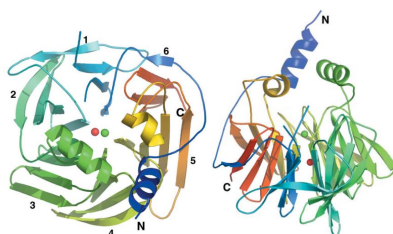
La síntesi de PON1 es troba principalment en el fetge, tal i com ho han demostrat anàlisis per Northern Blot de mostres humanes i de conill<sup>229</sup>. Contradictòriament, estudis d'expressió gènica realitzats en teixits de ratolí han identificat mRNA de PON1 en fetge, ronyó, cor, cervell, intestí i pulmó. Sorprenentment, en un estudi realitzat pel mateix grup d'investigació, s'ha detectat, mitjançant immunohistoquímica, PON1 i PON3 en gairebé tots els teixits de ratolí, a diferència de PON2, l'expressió de la qual es limita a pocs teixits<sup>230</sup>. Aquestes troballes obren un debat sobre si PON1 (i PON3) es sintetitzen de forma local als teixits o provenen de l'HDL circulant, obren dubtes al voltant de PON2, i permeten hipotetitzar sobre el possible paper que podrien tenir aquests enzims en altres malalties on l'estrès oxidatiu hi estigui implicat, donada la seva expressió proteica ubíqua.

## Funció fisiològica de PON1

Els substrats correntment utilitzats per determinar l'activitat PON1 no es troben de forma natural en l'organisme, donat que són altament tòxics. Alguns estudis van arribar a la conclusió que PON1 protegeix la LDL i HDL de la peroxidació lipídica, degradant colesterilèsters i fosfolípids oxidats específics, continguts en les lipoproteïnes oxidades<sup>231-236</sup>. Cal destacar que el mecanisme d'hidròlisi de lipoperòxids és diferent al dels altres substrats de PON1, ja que el grup sulfhidril lliure de la cisteïna 284 s'ha demostrat que és necessari per a l'activitat de l'enzim front a lipoperòxids<sup>237</sup>, però no per a la seva activitat front a paraoxó o altres xenobiòtics. Els estudis realitzats amb animals d'experimentació, recolzen aquesta funció antioxidant de PON1<sup>238-241</sup>. Per altra banda, la sobreexpressió de PON1 humana en un ratolí inhibeix la formació de peròxids lipídics en l'HDL i protegeix l'estructura i funció de la LDL<sup>241</sup>. Tot i que hi ha alguns estudis amb resultats contradictoris<sup>242</sup>, molts altres estudis demostren que PON1 hidrolitza peròxids lipídics<sup>243-245</sup>.

Tot i que inicialment es van identificar en humans, s'ha trobat PON i gens relacionats amb PON en peixos com el peix zebra i en l'invertebrat *Caenorhabditis elegans*<sup>246</sup>. Això indica que van aparèixer molt aviat en l'evolució i són presents en molts organismes, des d'invertebrats fins a mamífers<sup>247</sup>. Jensen<sup>24</sup> va proposar que, a diferència dels enzims evolutivament moderns, els enzims primitius posseïen àmplies especificitats, de manera que aquesta versatilitat catalítica permetia que amb pocs enzims es poguessin realitzar múltiples funcions necessàries per mantenir l'organisme ancestral. A aquesta propietat se l'anomena promiscuïtat enzimàtica<sup>249-251</sup>. Tal i com s'ha descrit, PON1 és un enzim amb un ampli espectre de substrats, com ara èsters, lactones<sup>252,253</sup> organofosforats com soman i sarina<sup>254</sup>, peròxids lipídics, i èsters d'estrògens<sup>255</sup>. A més, PON1 pot metabolitzar certs fàrmacs i ha estat proposada com a ús terapèutic en la inactivació de fàrmacs<sup>256,257</sup>. Donats els múltiples substrats que PON1 pot hidrolitzar, PON1 ha estat descrita com un enzim promiscu, de manera que part de la recerca al voltant d'aquest enzim es va centrar en distingir la funció nativa o ancestral de les altres funcions secundàries o adaptades. La dificultat en poder purificar PON1 per poder estudiar-ne l'estructura i el mecanisme d'acció, ha estat un dels inconvenients a l'hora d'estudiar l'activitat nativa. Les preparacions de PON1 purificada són inestables i sovint es contaminen. Una solució davant això rau en les metodologies d'evolució dirigida, gràcies a les quals s'ha pogut determinar tant l'estructura com la funció de l'enzim. Bàsicament, l'evolució dirigida consisteix en replicar el procés de l'evolució al laboratori, induint

mutacions artificials al gen d'interès, seguit d'una selecció i amplificació de les variants que millor mostrin les característiques desitjades. Va ser mitjançant aquesta tècnica, que Harel et al.<sup>258</sup> van determinar que PON1 s'estructura en forma de turbina B de sis fulles amb únic centre actiu involucrat en la unió a l'HDL (**Figura 22**). Al centre del túnel s'observen dos àtoms de calci. El calci inferior és probablement un calci estructural, donat que la seva dissociació condueix a una desnaturalització irreversible de l'enzim. En canvi, al calci superior se'l considera catalític<sup>259</sup>. Les tres hèlix, localitzades a la part superior de la turbina, estan involucrades en l'anclatge de PON1 a la partícula d'HDL. Dues de les tres hèlix es disposen deixant tancat el centre actiu.



**Figura 22.** Estructura de PON1. A) vista des de la part superior de la turbina beta amb les seves 6 fulles, amb els dos àtoms de calci centrals B) Vista de la turbina beta de costat. Adaptada de Harel et al.<sup>258</sup>

El mateix grup, mitjançant també estudis d'evolució dirigida, juntament amb estudis d'estructura-funció, van establir que la funció primordial de PON1 és el d'una lipolactonasa<sup>260-263</sup>. De fet, com veurem posteriorment, el denominador comú de les tres PONs és la seva activitat lactonasa<sup>252</sup>. Aquests estudis també van establir que els substrats preferits de PON1 eren els anells de lactones de 5 o 6 membres, típicament amb cadenes laterals alifàtiques<sup>257</sup>.

L'estudi de Harel et al. també proposa un mecanisme catalític de PON1, basat en la parella d'histidines His 115 i 134, totes dues molt properes al calci catalític<sup>258</sup>. Estudis de mutagènesi dirigida i cinètica han demostrat que aquesta parella His és necessària tant per l'activitat lactonasa de PON1, com per la degradació de lípids oxidats<sup>264,265</sup>. S'ha proposat un model que lliga ambdues accions<sup>265</sup>, el qual proposa que els lípids oxidats que contenen grups hidroxil a la posició 5 podrien ser lactonitzats per PON1 per formar els productes lisofosfatidilcolina i valerolactona. Així doncs, segons aquesta hipòtesi, la capacitat de PON1 per degradar peròxids lipídics és secundària a la seva activitat lipolactonasa.

## PON1, HDL i inflamació

Molts estudis experimentals demostren l'existència d'una estreta relació entre peroxidació lipídica i inflamació<sup>266</sup>. S'ha demostrat que les partícules d'HDL posseeixen propietats antioxidants i anti-inflamatòries<sup>267-270</sup>. La CCL-2 està molt estretament lligada a la reacció inflamatòria. Aquesta quimioquina regula la migració de monòcits als teixits i la seva subseqüent diferenciació a macròfags<sup>271</sup>. Un producte final de la peroxidació lipídica, el 4-HNE i almenys dos fosfolípids oxidats presents en les LDL oxidades, poden estimular la producció de CCL-2 *in vitro*<sup>272, 273</sup>. S'ha demostrat *in vitro* que l'HDL pot atenuar l'estimulació de la migració de monòcits induïda per la LDL oxidada<sup>274</sup>, és a dir, que l'HDL pot suprimir la producció de CCL-2. PON1 actua com un enzim antioxidant, de manera que potser podria participar en aquesta funció antiinflamatòria de l'HDL. Mackness et al.<sup>275</sup> van ser els primers en demostrar que PON1 podia inhibir la producció de CCL-2 en cèl·lules endotelials incubades amb LDL oxidada. Aquests autors van trobar que tant l'HDL, com PON1 recombinant, abolien la producció de CCL-2, mentre que HDL d'origen aviar (la qual, a diferència de la humana, no té PON1) no tenia aquesta capacitat. Sembla ser que aquesta inhibició de CCL-2 per part de PON1 és deguda a la seva capacitat per inhibir la oxidació de les LDL. Els estudis amb animals d'experimentació recolzen aquesta funció antiinflamatòria de PON1. La generació del ratolí hPON1Tg, alimentat amb dietes pro-aterogèniques, ha demostrat que aquest ratolí desenvolupa menys lesions arterioscleròtiques, menys estrès oxidatiu, i té al voltant d'un 44% menys d'expressió de CCL-2 en les aortes, comparat amb els mateixos ratolins sense modificacions genètiques (*wild-type*)<sup>276</sup>. S'han obtingut resultats similars en models experimentals de ratolins amb obesitat i síndrome metabòlica quan se'ls sobreexpressava PON1 humana<sup>277</sup>.

Estudis posteriors han mostrat que aquesta funció antioxidant i antiinflamatòria de PON1 és complexa i que involucra no només inhibició de la peroxidació sinó també un augment en l'eflux de colesterol dels macròfags via HDL. Estudis amb cultius de macròfags incubats amb HDL derivada del ratolí hPON1Tg van evidenciar que PON1 augmentava l'eflux de colesterol mitjançant l'increment en el contingut en lisofosfatidilcolina en el macròfag, la qual estimula l'acció del transportador *ATP-binding cassette 1* (ABCA1), fent que l'HDL s'uneixi a les cèl·lules, i també estimula la recaptació de colesterol per part de l'HDL<sup>278</sup>.

Resumint, sembla clar que PON1 inhibeix la transmigració dels monòcits/macròfags induïda per l'estrès oxidatiu, degut a la seva capacitat de degradar peròxids lipídics i inhibint la producció de CCL-2 per part de les cèl·lules, i també degut a la seva capacitat per augmentar l'eflux de colesterol dels macròfags a l'HDL via síntesi de fosfatidilcolina i activació d'ABCA1. Tot això proporciona un mecanisme que uneix peroxidació lipídica i inflamació, amb les funcions de PON1 i HDL. La molècula d'HDL constitueix un entorn natural per a l'activitat enzimàtica de PON1, i aquesta és molt sensible a alteracions en la partícula d'HDL. Fins i tot en l'HDL normal, es localitza PON1 activa en fraccions molt específiques de l'HDL<sup>279</sup>. PON1 necessita l'apolipoproteïna A-I (apo A-I) per a la seva activitat. Contràriament, la presència d'apo A-II en l'HDL s'associa a inactivació de PON1<sup>280</sup>.

Per exemple, moltes malalties infeccioses i inflamatòries porten associada una resposta de fase aguda. Es sap que tres reactants de fase aguda, la proteïna C reactiva (PCR), la proteïna del sèrum amiloide A (SAA), i la ceruloplasmina, interaccionen amb les lipoproteïnes<sup>281</sup>. Durant aquesta resposta de fase aguda, les HDL s'enriqueixen de SAA i ceruloplasmina, i perden apo A-I<sup>282</sup>. S'ha demostrat que en aquestes HDL de fase aguda, l'activitat PON1 disminueix degut a la necessitat d'apo A-I per a la seva activitat. A més, aquesta HDL és incapaç de protegir la LDL de l'oxidació *in vitro* i de l'augment en la síntesi de CCL-2 per part de monòcits en cultiu. Addicionalment, aquesta HDL, a part d'inactivar PON1, és capaç d'inhibir la seva expressió hepàtica<sup>283</sup>.

## 9.2 La Paraoxonasa 2

Encara que PON1 ha estat l'enzim més estudiat, es pensa que PON2 és el membre més antic de la família PON, en quant a l'homologia estructural i la distància evolutiva prevista entre ells.<sup>284</sup>

PON2 és una proteïna intracel·lular, amb un pes molecular de 44 kDa. Aquest enzim no actua contra els substrats organofosforats, sinó que té activitat de lactosa<sup>85</sup>. Involucrada en l'estrès oxidatiu, la inflamació i la regulació de la detecció de quòrum.

Ng et al.<sup>189</sup> va informar que PON2 no estava present en circulació, almenys no en nivells mesurables pels mètodes actuals, mentre que la seva expressió gènica es va detectar en diversos

teixits humans amb una localització en la membrana plasmàtica, que suggereix funcions diferents de les observades per PON1 i PON3. Els autors, mitjançant l'ús de cèl·lules transfectades amb el gen PON2 humà, van demostrar que aquestes cèl·lules tenen una capacitat antioxidant més alta i són menys efectives en l'oxidació de les LDL que aquelles que no van ser transfectades. A més, diversos estudis en ratolins modificats genèticament van demostrar de nou les propietats antiaterogèniques de PON2. Els ratolins deficitaris de PON2 presenten nivells superiors de teixits d'hidroperòxids lipídics, donant lloc a un augment de la migració dels macròfags a la paret arterial i, en conseqüència, a lesions d'aterosclerosi més severes que els ratolins de control. D'altra banda, el LDL aïllat d'aquests ratolins era més susceptible a l'oxidació i provocava més quimiotaxis monòcits. Els macròfags aïllats de ratolins deficitaris de PON2 són més susceptibles a l'estrès oxidatiu i també mostren un augment de la expressió gènica de la necrosi tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) i de la interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) després de la inflamació induïda per lipoproteïnes (LP)<sup>286</sup>. PON2 també protegeix contra l'acumulació de triglicèrids de macròfags, inhibint la seva conversió a cèl·lules d'escuma<sup>287-288</sup>.

A més, PON2 té la capacitat d'hidrolitzar diversos productes bacterians, com les lactones d'acylhomarina, que permeten a les bactèries comunicar-se i coordinar la seva infecció. Aquest procés es coneix com a detecció de quòrum i s'intensifica en ratolins deficient PON2<sup>289,290</sup>.

D'altra banda, PON2 juga un paper important en l'estrès oxidatiu mitocondrial i l'estrès en ER, que participen en l'apoptosi cel·lular, l'envelliment prematur i el càncer<sup>91</sup>. Diversos estudis van mostrar un augment de l'expressió de gens PON2 en el càncer de pròstata, el carcinoma hepatocel·lular i la leucèmia limfoblàstica aguda<sup>292-294</sup>. Altenhofer et al.<sup>295</sup> va demostrar que PON2 reduïa l'alliberació de superòxid a partir de la membrana mitocondrial interna, independentment de si resultés del complex I o complex III de la cadena de transport d'electrons mitjançant la modulació de les quinones. Rosenblat et al.<sup>296</sup> va observar que PON2 estava localitzada a l'interior de les membranes del ER i mitocòndries en macròfags.

Horke et al.<sup>297</sup> van ser els primers a determinar que PON2 redueix l'activació de la caspasa induïda per estrès del ER. Van observar que PON2 es va associar amb la membrana nuclear i l'ER i es va induir tant en el promotor com en la proteïna mitjançant la resposta a la proteïna desenvolupada per la via d'estrès ER. Un any més tard, els mateixos autors van demostrar que

PON2 protegeix contra la mortalitat cel·lular mediada per l'estrès IR, regulant l'homeòstasi del calci<sup>298</sup>. Ha estat Observat per Devarajan et al.<sup>299</sup> que el macròfag PON2 modula l'homeòstasi i la supervivència cel·lular sota condicions d'estrès i és suficient per prevenir el desenvolupament de l'aterosclerosi en ratolins PON2 i apoE de doble deficient alimentats amb una dieta occidental. Les seves observacions suggereixen que PON2 regula els mecanismes que uneixen la disfunció mitocondrial, l'estrès de l'ER i el desenvolupament de l'aterosclerosi.

S'han descrit dos polimorfismes genètics PON2, PON2<sub>148</sub> (A/G) i PON2<sub>311</sub> (S/C). El polimorfisme PON2<sub>148</sub> implica una substitució d'aminoàcids de glicina per alanina a la posició 148 a la regió de codificació i PON2<sub>311</sub> implica una substitució de serina per cisteïna a la posició 311 a la regió de codificació. Hegele et al.<sup>300</sup> va informar que el polimorfisme PON2<sub>148</sub> es va associar amb el tractament de la glucosa en pacients amb diabetis mellitus no dependents d'insulina en una població canadenca aïllada genèticament; els individus de GG mostren la pitjor hiperglucèmia en dejú. A més, ambdós polimorfismes es van associar amb variacions en la concentració de colesterol sèric i apolipoproteïna A-I en una altra població canadenca aïllada genèticament<sup>301</sup> i PON2<sub>311</sub> va afectar el risc de malaltia cardiovascular en els indis asiàtics<sup>302</sup>. Recentment alteres estudis van mostrar que els polimorfismes PON2<sub>148</sub> i PON2<sub>311</sub> afecten la seva capacitat per hidrolitzar diverses lactones<sup>303</sup>.

Malgrat aquests resultats, un recent metanàlisis que incloïa set estudis amb una gran quantitat de casos i controls no observava cap correlació significativa entre el polimorfisme PON2<sub>311</sub> i el risc d'accident vascular cerebral isquèmic<sup>304</sup>. A més, un altre estudi no va mostrar cap associació significativa entre els polimorfismes de gens PON2, la diabetis mellitus, les malalties cardiovasculars o la malaltia renal dels participants a Mèxic<sup>305</sup>.

### 9.3 La Paraoxonasa 3

PON3 és l'últim enzim identificat de la família PON i el pitjor caracteritzat. El seu pes molecular és d'aproximadament 44 kDa i, com PON1, està lligat a HDL però en una concentració menor<sup>306</sup>. A més, com PON2, no és capaç d'hidrolitzar el paraoxon o altres compostos xenobiòtics, sinó que té activitat de lactonasa<sup>285, 306</sup>.

Diversos estudis informen que PON2 i PON3 tenen una funció similar i una associació de tipus cel·lular similar<sup>307-309</sup>. Els estudis in vitro van demostrar que PON3 és capaç d'evitar l'oxidació del LDL<sup>308</sup>. A més, Shih et al.<sup>310</sup> va informar que l'alta expressió de PON3 disminueix significativament la formació arterioscleròtica i l'adipositat en ratolins modificats.

Curiosament, Schweikert et al.<sup>311</sup> van mostrar que les mitocòndries aïllades de fetge deficient PON3 tenen una funció alterada en comparació amb els ratolins de control. D'altra banda, els autors van demostrar que hi ha un augment de l'expressió de PON3 en tumors humans i que PON3 redueix la formació de superòxid mitocondrial mitjançant la seqüenciació de ubisemiquinona en cèl·lules cancerígenes, provocant una millor resistència a la mort cel·lular.

PON3 també és un enzim polimòrfic, i els seus polimorfismes s'han descrit recentment. Estan ubicats a la regió promotora i el seu paper fisiològic encara no està clar.

#### **9.4. La Paraoxonasa 1 i les malalties no transmissibles**

Les MNT es recolzen en l'associació de l'estrès oxidatiu i la inflamació. La inflamació crònica està relacionada amb l'oxidació, les cascades antiinflamatòries estan associades a la reducció de l'oxidació, l'augment de l'estrès oxidatiu produeix inflamació i l'equilibri redox inhibeix la resposta cel·lular inflamatòria. Tant si l'estrès oxidatiu com la inflamació són o no la causa o la conseqüència de la patologia cel·lular, si que participen de forma significativa a la patogènia i al desenvolupament de les MNT. Probablement, les complicacions de les MNT estan relacionades, augmentant el seu risc de desenvolupar altres comorbiditats. Per exemple, els pacients amb obesitat tenen un major risc de desenvolupar aterosclerosi, diabetis mellitus tipus 2, càncer i altres malalties relacionades amb l'edat.

##### Relació amb les malalties cardiovasculars

Les malalties cardiovasculars (MCV) inclouen una classe de trastorns que comprenen vasos sanguinis del cor i sistèmics<sup>312</sup>. L'estil de vida, els factors genètics, epigenètics i ambientals poden influir en el risc de desenvolupar MCV.

Els esdeveniments patològics inicials de les MCV són difícils d'esbrinar a causa del seu fons multifactorial, i que sovint són subclínic. Es considera que la inflamació juga un paper important

en la iniciació i la progressió de la malaltia<sup>313</sup>.

El procés patològic més comú que desencadena les MCV (infart de miocardi, insuficiència cardíaca, ictus i claudicació) és l'aterosclerosi<sup>312</sup>. L'arteriosclerosi es defineix com una malaltia crònica i progressiva caracteritzada per una resposta inflamatòria de la paret arterial a les lesions promogudes per factors de risc com la diabetis, la dislipèmia, la hipertensió i altres<sup>314</sup>. El principal factor de risc de l'aterosclerosi és la hipercolesterolèmia. En realitat, és ben conegut que l'aterosclerosi és l'acumulació de greixos en les parets arterials i, a més, és un procés complex que involucra processos immunitaris innats i adaptatius<sup>314, 315</sup>.

Breument, el procés aterogènic s'inicia en llocs on l'endoteli se sotmet a l'estrès de cisallament com l'arc aòrtic, l'arrel aorta, les artèries renals i l'artèria mesentèrica superior. En conseqüència, s'observa una disfunció endotelial i alteració de la permeabilitat de la capa íntima, provocant la migració de LDL a l'espai sub-endotelial<sup>316</sup>. L'endoteli activat per factors de risc condueix a l'expressió de molècules com E-selectina, molècula d'adhesió intercel·lular (I-CAM) i molècules d'adhesió cel·lular vascular (VCAM), que atreuen monòcits. Una vegada que els monòcits han migrat a la capa mediàtica de l'artèria, es diferencien en els macròfags dels teixits. Expressen receptors d'escavatge i cèl·lules d'escuma<sup>317</sup> que donen oxLDL a fagòcits. Les cèl·lules inflamatòries alliberen factors de creixement i citocines que contribueixen a la formació d'una tapa fibrosa de múscul llis i matriu extracel·lular al voltant del nucli lipídic, que compromet la llum dels vasos<sup>314,315,318</sup>. Per tant, la ruptura de la placa representa el major esdeveniment associat a l'aterosclerosi. Les plaques arterioscleròtiques es caracteritzen per tenir àrees necròtiques, calcificacions, acumulació de lípids modificats i cèl·lules d'escuma i també altres tipus de cèl·lules (cèl·lules T, cèl·lules endotelials, cèl·lules musculars llises i cèl·lules dendrítiques vasculares)<sup>319</sup>. L'acumulació de monòcits / macròfags en el lloc de lesió és un factor clau en el procés aterogènic i implica diversos passos, com ara l'expressió de molècules d'adhesió i factors quimiotàctics que provoquen el reclutament de monòcits i, per tant, l'activació de processos de diferenciació juntament amb la proliferació i immobilització de macròfags a la placa inflamada<sup>320</sup>.

En particular, el lligand 2 de quimiocina (CCL2), anteriorment anomenat MCP-1, està íntimament implicat en la reacció inflamatòria. Aquesta quimioquina regula la migració de monòcits als teixits i la seva posterior diferenciació als macròfags<sup>321</sup>. El CCL2 pot ser secretat per

diverses cèl·lules com cèl·lules endotelials, cèl·lules T, cèl·lules musculars llises, monòcits, macròfags i cèl·lules d'escuma, perpetuant la inflamació i l'acumulació de lípids en l'ateroma<sup>322</sup>.

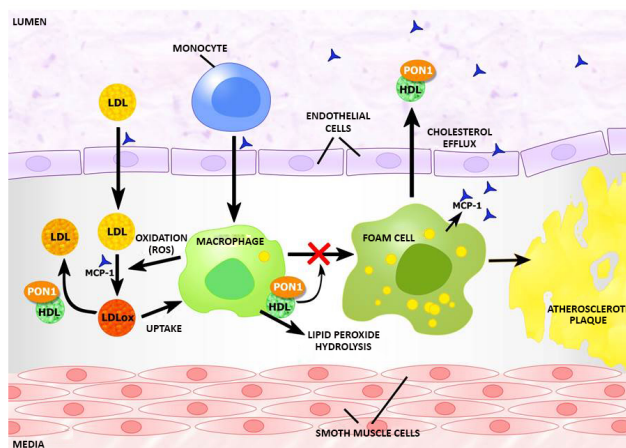
Els primers estudis van informar que el CCL2 està present en plaques arterioscleròtiques riques en macròfags en humans<sup>323</sup> i primats<sup>324</sup>. Els lípids oxidats han estat implicats durant molt de temps com a mediadors de l'arteriosclerosi i la formació d'espècies cel·lulars<sup>325</sup>. Estudis de Cushing et al.<sup>326</sup> van demostrar que les LDLs oxidades induïen la producció de CCL-2 en cèl·lules vasculars, com ara cèl·lules endotelials i cèl·lules musculars llises. CCL-2 va sorgir així com un possible enllaç molecular entre les lipoproteïnes oxidades i la captació de cèl·lules d'escuma a la paret del vas. A més, Stephen et al.<sup>319</sup>, que el CCL-2 induïx una disminució de l'expressió dels receptors de LDL i un augment del receptor d'escurçó (responsable de la fagocitosi de oxLDL). Notablement, Hashizume i Mihara<sup>326</sup> van investigar la influència de la interleucina-6 (IL-6) i del TNF- $\alpha$  sobre l'expressió del receptor de cribratge en cèl·lules endotelials arterials humanes. Van observar un augment en l'expressió del receptor de la neteja i també van informar que la CCL-2 induïda per oxLDL va augmentar per la presència d'IL-6 i TNF- $\alpha$ . Per tant, IL-6 i TNF- $\alpha$  promouen una reacció positiva de la inflamació i l'aterogènesi i suggereix que ambdós estan implicats en el procés d'aterogènesi també a través de la inducció oxLDL/CCL-2. A més, CCL-2 és responsable de la ruptura i la trombosi de la placa ateroscleròtica<sup>327</sup>.

A l'altre costat, les partícules HDL han demostrat tenir antioxidants<sup>328-330</sup> i propietats antiinflamatòries, inclosa la supressió de les molècules d'adhesió d'una cèl·lula endotelial (CAM)<sup>331</sup>. A més, es va demostrar que Apo A-I en HDL estableix PON1 i promou de forma significativa la seva activitat de lactonasa<sup>332</sup>. Per contra, la presència d'Apo A-II en HDL està associada a la inactivació PON1<sup>333</sup>. En el sèrum, la proteïna PON1 protegeix tant la LDL com l'HDL contra la peroxidació de lípids i preserva els seus efectes antiteratogènics mitjançant la inhibició de l'oxidació HDL<sup>280,334,335</sup>. Mackness et al.<sup>336</sup> va mostrar per primera vegada que PON1 inhibeix la producció de CCL-2 en cèl·lules endotelials incubades amb oxLDL. Van descobrir que l'HDL, així com la PON1 recombinant, van abolir la producció de CCL-2 en cèl·lules endotelials cultius, mentre que HDL aviar no va poder provocar aquesta reacció (l'HDL aviar no té PON1).

Diversos estudis avalen el concepte d'una funció antiinflamatòria de PON1. Tward et al.<sup>337</sup> va avaluar la sobreexpressió del PON1 humà en ratolins alimentats amb una dieta arterioscleròtica.

Aquests autors van observar que els ratolins van desenvolupar menys lesions arterioscleròtiques, menor estrès oxidatiu i un 44% menys d'expressió CCL-2 en les seves aortes que els seus ratolins de control corresponents. Rozenberg et al.<sup>338</sup> va mostrar que els ratolins deficient PON1 tenien una major peroxidació lipídica perifèrica i un major grau d'estrès oxidatiu de macròfags. Les investigacions posteriors van observar que la funció de PON1 (antioxidant i antiinflamatori) és multifacètica i pot incloure no només una inhibició de la peroxidació de lípids sinó també un augment de l'eflux de colesterol de macròfags a través de l'HDL. Rosenblat et al.<sup>339</sup> macròfags cultius incubats amb HDL derivats de ratolins PON1-transgènics humans. Van observar que PON1 va millorar l'efluent del colesterol, a través d'un augment del contingut de lisofosfatidilcolina de macròfags, que va estimular l'acció del ABCA1, l'enllaç HDL a les cèl·lules i l'absorció del colesterol per aquesta lipoproteïna. Un altre estudi<sup>340</sup> en ratolins deficients del receptor Apo A-I i LDL mostrava activitats de PON1 sèriques més baixes, disminució del transport colesterol invers, augment del desenvolupament d'aterosclerosi i concentracions de CCL-2 augmentades.

Tenint en compte totes aquestes dades, sembla plausible que PON1 inhibeix la transmigració de monòcits / macròfags induïda per l'estrès oxidatiu degut a la seva capacitat per degradar els peròxids lipídics i regular la producció de CCL-2 per cèl·lules endotelials vasculars, així com per la seva capacitat per augmentar els macròfags, el colesterol associat a través de la síntesi de lisofosfatidilcolina i l'activació de l'ABCA1<sup>341</sup>. Aquesta raó ofereix un mecanisme clar que connecta la peroxidació de lípids, la inflamació i les funcions de protecció de PON1 i HDL contra l'aterogènesi (**Figura 23**).



**Figura 23** . Representació del paper de PON1 en el procés d'arteriosclerosi. Els monòcits circulants s'activen com a conseqüència d'un medi pro-oxidant i proinflamatori i es converteixen en macròfags. Les partícules de LDL també entren al vaixell. Els macròfags promouen l'oxidació de les LDL per l'alliberament dels radicals lliures. El LDL oxidat entra en macròfags per mitjà del receptor de neteja i contribueix a la seva conversió a cèl·lules d'escuma. La presència d'oxidacions de macròfags de la formació de cèl·lules de LDL i escuma són distintius de l'aterogènesi inicial. La hidròlisi de les LDL oxidades per PON1 reverteix aquesta lipoproteïna al LDL normal i, com a conseqüència, atenua el desenvolupament de l'arteriosclerosi. PON1, mitjançant la inhibició de la producció de MCP-1, és antiinflamatori i afavoreix l'efluent del colesterol dels macròfags. Adaptat des de *Camps et al.* <sup>342</sup>

### Relació amb la diabetis

La diabetis està associada a alts nivells d'estrès oxidatiu <sup>343</sup>. Hi ha dades que mostren que la formació de ROS és una conseqüència directa d'hiperglucèmia <sup>344</sup>. Els sistemes antioxidants són mecanismes importants per defensar l'organisme del dany induït per estrès oxidatiu i el desequilibri en el mecanisme redox pot desencadenar la patologia o les complicacions de la diabetis <sup>345, 346</sup>.

A la dècada de 1990, diversos informes van mostrar associacions entre els polimorfismes PON1<sub>192</sub>, PON1<sub>55</sub> i PON1<sub>108</sub> i les complicacions cardiovasculars en pacients diabètics <sup>347</sup>. La presència d'al·lels RR, LL i TT es va associar significativament amb majors taxes d'esdeveniments cardíacs adversos. A més, Letellier et al. <sup>348</sup> també va informar que l'activitat de PON1 disminueix en pacients diabètics. A més, els pacients diabètics tenen el seu PON1 en HDL glicats i, com a resultat, tenen una capacitat reduïda de metabolitzar hidroperòxids de membrana <sup>349,350</sup>. A més, els estudis en ratolins deficientes PON1 i ratolins transgènics PON1 van mostrar el paper protector de PON1

contra la diabetis induïda per estreptozotocina. La sobreexpressió de PON1 es va associar amb una reducció de l'estrès oxidatiu de macròfags induïts per diabetis, un menor desenvolupament de la diabetis i una mortalitat reduïda, en comparació amb els ratolins de control, i més encara quan es van comparar amb ratolins deficient PON1<sup>351</sup>.

L'augment de l'estrès oxidatiu en pacients diabètics desencadena en detriment de l'activitat PON1. De fet, la disminució de l'activitat de PON1 es correlaciona inversament amb els nivells d'oxLDL plasma en aquests pacients<sup>352</sup>.

Diversos estudis van demostrar que hauria de ser necessària l'administració d'antioxidants nutricionals per preservar o mantenir l'activitat de PON1 en pacients que presenten un elevat estrès oxidatiu. El consum de suc de magrana en pacients diabètics va provocar un augment significatiu en l'activitat de PON1 sèric i, en conseqüència, una reducció de l'estrès oxidatiu sèric<sup>354</sup> i, a més, va augmentar l'enllaç PON1 a HDL, resultant en l'activació PON1<sup>355</sup>. Estudis in vitro van demostrar que la presència d'antioxidants naturals com la quercetina (del vi negre), els flavonoides glabridina (d'arrel de regalèssia) o la punicalagina (a partir de magrana), durant l'oxidació LDL, juntament amb PON1, van reduir la peroxidació i conservar les activitats PON1<sup>356</sup>. Un dels tractaments farmacològics comuns de la diabetis és l'administració de metformina. La metformina és una biguanida i es deriva de la gallegrina, extreta de la planta *Galega officinalis*<sup>357</sup>. La droga està àmpliament recolzada com a teràpia inicial per organitzacions professionals a causa del seu baix cost, perfil de seguretat i possibles beneficis cardiovasculars<sup>358</sup>.

La metformina actua primerament en el fetge disminuint la producció de glucosa, secundàriament, augmentant l'absorció de la glucosa en els teixits perifèrics (principalment músculs) i, finalment, augmentant la  $\beta$ -oxidació en el teixit adipós<sup>359-364</sup>. Aquests efectes estan mediat per l'activació d'un 5 monosfosfat d'adenosina (AMP) - proteïna quinasa activada (AMPK)<sup>361,363</sup>. L'AMPK és un complex heterotrimèric que s'activa per un augment de la relació AMP / ATP, i es considera un sensor d'energia cel·lular que contribueix a regular l'equilibri energètic i la ingesta calòrica. Una vegada activat, AMPK inhibeix els processos anabolitzants que requereixen energia i, en canvi, activa processos catabolitzants que produeixen energia. A continuació, AMPK participa en la regulació de la glicòlisi, la captació de glucosa, l'oxidació lipídica, la síntesi d'àcids grassos, la síntesi del colesterol i la gluconeogènesi i s'ha considerat com un possible enzim

objectiu en el tractament d'algunes malalties com l'obesitat, la diabetis tipus 2 i l'esteatosi hepàtica<sup>363,364</sup>. A més, la metformina té propietats antioxidants que no estan completament caracteritzades. És capaç de reduir el ROS mitjançant la inhibició de la respiració mitocondrial<sup>365</sup> i la reducció del producte final de glicosilació avançada (AGE) indirectament a través de la disminució de la hiperglucèmia i directament a través d'un mecanisme dependent de la insulina<sup>366</sup>.

### Relació amb el càncer

L'estrès oxidatiu a la cèl·lula desencadena el dany de l'ADN i pot contribuir al creixement neoplàsic. Coneguts pels efectes antioxidants extensius de PON1, diversos estudis han investigat l'associació del polimorfisme PON1 funcional amb risc de càncer. Una metaanàlisi recent (inclosos 25 estudis) ha reportat evidència sòlida d'un vincle entre la mutació del polimorfisme PON1<sub>55</sub>, que condueix a una reducció de l'activitat enzimàtica PON1 i al risc general del càncer. A més, els investigadors classificats per tipus de càncer, reporten un alt risc de càncer de pròstata i mama per als pacients que porten el fenotip MM. Pel que fa a PON1<sub>192</sub>, van trobar un risc de reducció del càncer per a les persones d'ascendència asiàtica que porten el fenotip RR, la qual cosa augmenta significativament l'activitat de la paraoxonasa PON1<sup>367</sup>. A més, altres metanàlisis del càncer de mama han reportat resultats similars respecte al polimorfisme PON1<sub>192</sub> i PON1<sub>55</sub><sup>368</sup>.

### Relació amb els trastorns neurològics

L'estrès oxidatiu juga un paper clau en moltes malalties neurovegetatives, com l'Alzheimer i les malalties de Parkinson, entre d'altres.

La malaltia d'Alzheimer és la principal causa de la demència que comença amb una memòria compromesa<sup>369</sup>. La patogènesi de la malaltia d'Alzheimer comprèn les plaques amiloides extracel·lulars difuses i neurítiques en el teixit cerebral, que sovint estan envoltats per neurites distròfiques i cabdells neurofibril·lars intraneuronals<sup>370</sup>.

Diversos estudis, incloent els pacients amb malaltia d'Alzheimer van trobar una reducció en l'activitat PON1 pel que fa als subjectes control<sup>371, 372</sup>. A més, Wehr et al. Es va observar una correlació negativa entre l'activitat de PON1 i l'homocisteïna (activitat de la lactonasa sobre els fosfolípids oxidats i els nivells d'homocisteïna-tiolactona) en pacients amb malaltia d'Alzheimer<sup>372</sup>. Diversos estudis han abordat l'associació entre el polimorfisme PON1 i la malaltia d'Alzheimer. No

obstant això, hi ha observacions controvertides respecte a aquest tema. Wingo et al. No es va observar cap associació entre els polimorfismes PON1<sub>192</sub> i PON1<sub>55</sub> en afroamericans o caucàsics<sup>373</sup>. Tanmateix, un altre estudi de la Xina va demostrar que el polimorfisme PON1<sub>192</sub> està associat a la malaltia d'Alzheimer en 1000 subjectes (casos i controls)<sup>374</sup>.

Una recent metaanàlisi realitzada a la Xina va demostrar que no hi va haver una associació significativa entre els dos polimorfismes i la malaltia<sup>375</sup>.

D'altra banda, la malaltia de Parkinson és un trastorn neurodegeneratiu. Està relacionat amb la degeneració progressiva de les neurones productores de dopamina en la substància negra del cervell mitjà. L'etiologia de la malaltia no és ben entesa i es sospita la interacció de la susceptibilitat genètica amb factors ambientals<sup>376</sup>.

L'exposició a organofosfats ha estat reconeguda com un factor de risc per a la malaltia de Parkinson en alguns estudis epidemiològics<sup>377, 378</sup>. Diversos estudis han investigat PON1 com un possible gen candidat per al risc de malaltia de Parkinson, però l'evidència directa dels estudis d'associació genètica continua sent polèmica.

Una metaanàlisi recent de dotze estudis (nou implicats caucàsics i tres implicats asiàtics) va suggerir que els polimorfismes PON1<sub>55</sub> i PON1<sub>192</sub> no tenien associació per a la malaltia de Parkinson<sup>379</sup>. Per contra, existeixen evidències sòlides existents que suggereixen que hi ha una correlació entre la presència de determinats genotips i el desenvolupament de la malaltia en entorns tòxics<sup>373, 380, 381</sup>.

### El paper de l'obesitat en les malalties no transmissibles

L'obesitat es considera un factor de risc important per al desenvolupament de l'arteriosclerosi, MCV, diabetis mellitus tipus 2, càncer, malaltia hepàtica greix no alcohòlica (NAFLD) i altres malalties relacionades amb l'edat<sup>382</sup>.

Una de les conseqüències per al sobrepès o l'obesitat és l'alteració de l'homeòstasi ER i la seva correcta funcionalitat, que desencadena un estrès d'ER conegut per l'estat. El mecanisme pel qual la cèl·lula tracta de restaurar l'homeòstasi cel·lular es coneix com a resposta a proteïnes no desenvolupada (UPR). El paper principal d'aquesta resposta cel·lular és restablir el funcionament

normal de l'ER, utilitzant diverses estratègies. No obstant això, si això és insuficient per pal·liar l'estrès, la UPR condueix a la mort cel·lular. La disfunció de l'ER, la inflamació crònica i la consegüent UPR tenen un paper important en la patogènia dels trastorns metabòlics induïts. L'excés nutricional s'emmagatzema en el teixit adipós, però la seva capacitat és limitada. Quan això passa, els adipòcits presenten símptomes d'estrès vinculats a la disfunció metabòlica i la malaltia <sup>383</sup>. D'altra banda, PON2 juga un paper important en l'estrès oxidatiu mitocondrial i l'estrès ER). Diversos estudis van demostrar que PON2 es troba dins de les membranes d'ER<sup>297, 298</sup>. L'expressió PON2 es induïx tant en el promotor com en els nivells de proteïnes mitjançant l'apoptosi inhibidora de l'estrès ER. A més, PON2 protegeix contra l'estrès del ER mitjançant la regulació de l'homeòstasi del calci <sup>298, 299</sup>. Per tant, PON2 és un important mecanisme de defensa endògena contra l'estrès oxidatiu i la mort cel·lular induïda per UPR.

D'altra banda, la creixent prevalença d'obesitat tant en nens com en adults també provoca un augment del NAFLD, acceptat mundialment com la causa més freqüent de malaltia hepàtica crònica <sup>383, 384</sup>.

A més, el NAFLD està associat amb la resistència a la insulina i altres factors de risc metabòlics (diabetis mellitus, dislipèmia, obesitat abdominal central i MCV). La seva prevalença també augmenta amb l'edat i està influïda per la genètica. Altres factors de risc d'aquesta malaltia són el sexe, l'etnicitat i les infeccions cròniques <sup>383, 385</sup>.

El NAFLD (també conegut com esteatosi hepàtica) es caracteritza per la presència d'una quantitat important d'acumulació de lípids en el parènquima hepàtic (que afecta a  $\geq 5\%$  d'hepatòcits), en absència d'excés de consum d'alcohol. Aquests dipòsits hepàtics condueixen a un ampli espectre de dany hepàtic. L'esteatosi hepàtica pot progressar fins a convertir-se en esteatohepatitis no alcohòlica (NASH), que es caracteritza per la combinació de greixos en el parènquima hepàtic amb inflamació, inflamació lobulant i inflamació de l'hepatòcit i fibrosi i cirrosi que poden produir un carcinoma hepatocel·lular i insuficiència hepàtica <sup>386, 387</sup>.

El fetge és un òrgan metabòlic que realitza importants funcions bioquímiques essencials per a l'homeòstasi metabòlica i és un dels principals reguladors del metabolisme de glucosa i lípids. En el cas del NAFLD, es poden trobar diversos trastorns en la capacitat del fetge per processar lípids i això s'ha associat a alteracions multifactorials en la dieta, la genètica, la regulació hormonal,

el teixit adipós, el sistema immunitari i la microbiota intestinal.

La quantitat de lípids existents en hepatòcits representa una interacció multifacètica entre:

a) absorció de triglicèrids plasmàtics circulants o àcids grassos lliures (provinents de lipòlisis en teixit adipós), b) lipogènesi de novo en el fetge, c) oxidació d'àcids grassos i d) exportació d'àcids grassos en lipoproteïnes de molt baixa densitat (VLDL)<sup>388-390</sup>.

L'acumulació intrahepàtica d'àcids grassos en el fetge és una font d'inflamació i estrès oxidatiu que pot ser responsable de la progressió del NAFLD a NASH i pot predisposar-se a lesions més greus. Diversos mecanismes antioxidants enzimàtics protegeixen el fetge de lesions oxidatives. Un d'ells és PON1, a través del seu paper protector contra l'estrès oxidatiu. A més, el fetge juga un paper clau en la síntesi del sèrum PON1<sup>391-393</sup>. Investigacions de Ferré et al.<sup>394</sup> va mostrar una activitat microsomal reduïda de PON1 i un augment de la peroxidació lipídica en rates amb cirrosi induïda per CCL4. A més, van estudiar l'efecte de la suplementació dietètica de zinc, que és un metall que posseeix propietats antioxidants i antifibrogenètiques i que observa una normalització de la peroxidació de lípids i una millora de l'activitat de PON1 en rates que han estat tractats amb suplementes dietètics de zinc pel que fa a les rates de control.

Els estudis inicials havien observat una reducció significativa de l'activitat arilesterasa sèrica de PON1 en pacients amb cirrosi hepàtica<sup>395-397</sup>. Aquests informes van ser confirmats per Ferré et al.<sup>391,398</sup>. Van analitzar l'activitat de PON1 en pacients amb diversos graus de dany hepàtic crònic i, els seus estudis van mostrar una disminució significativa de l'activitat de PON1 sèric en pacients amb hepatitis crònica, i una disminució encara major en pacients cirròtics, en comparació amb un grup de control.

D'altra banda, el NAFLD sol ser una malaltia asimptomàtica. Les proves per a la disfunció hepàtica són insuficientment sensibles per a una indicació fiable d'absència o presència de malalties hepàtiques, i sovint es diagnostica fortuïtament després d'una anàlisi de sang de rutina o un estudi d'imatge per altres motius.

Actualment, la biòpsia hepàtica encara representa l'estàndard d'or per al diagnòstic del NAFLD. No obstant això, alguns metges i pacients estan indisposats per dur a terme aquest mètode invasiu. A més de l'error de mostreig, el diagnòstic depèn de l'experiència i la subjectivitat del

patòleg i el seu cost i morbiditat contribueix a la recerca de modalitats addicionals de diagnòstic i estadificació de la malaltia. En l'última dècada, s'han desenvolupat molts mètodes no invasius per disminuir la quantitat de biòpsies hepàtiques i superar els seus problemes<sup>399,400</sup>.

S'ha proposat un nombre creixent de biomarcadors potencials per al diagnòstic del NAFLD. Alguns estudis van informar que la mesura de l'activitat PON1 sèrica pot afegir informació valuosa en l'avaluació de l'abast del dany hepàtic, que pot obviar la necessitat de material biològic per a l'avaluació histològica. L'activitat PON1 del sèrum té una gran precisió diagnòstica a l'hora de diferenciar els pacients amb malaltia hepàtica dels subjectes controlats i, si s'afegeix a una prova estàndard de bateries de funcionament del fetge, augmenta la sensibilitat general sense danyar l'especificitat<sup>391,401</sup>.

HIPÒTESI

---



Els pacients que desenvolupen RD inicien la patologia amb canvis mínims en la retina que a poc a poc es van agreujant i tornant-se irreversibles amb un procés principal com a causant: l'estrès oxidatiu.

La hipòtesi central plantejada és que els enzims PON1 i PON3 juguen un paper molt important en la regulació de l'estrès oxidatiu i la resposta inflamatòria mediada per CCL-2, i pot ser un punt determinant per a desencadenar l'afectació microvascular retiniana que marcarà la progressió de la retinopatia diabètica. A partir d'aquí volíem estudiar, a part de la presència en humor vitri de PON1 i PON3, si existia alguna relació entre aquests i el grau d'afectació vascular retiniana.



## OBJECTIUS

---



### **Objectius principals**

1. Demostrar la presència de PON1 i 3 a les mostres d'humor vitri
2. Determinar els valors de PON 1 i 3 en sèrum/plasma i humor vitri en diabètics i en pacients diabètics amb EMDBT
3. Determinar la relació entre la PON 1 i 3 i el grau de RPDBT observada

### **Objectius secundaris**

1. Relacionar nivells de PON 1 i 3 en sèrum/plasma amb els de l'humor vitri
2. Relacionar el control metabòlic de la DM (a través dels valors d'hemoglobina glicosilada [HbA1c]) amb els nivells de PON 1 i 3 en sèrum/plasma i humor vitri
3. Relacionar les variables pròpies de la malaltia diabètica (tipus de DM, tractament, edat, hipertensió arterial [HTA], índex de massa corporal [IMC]) amb PON 1 i 3 en sèrum/plasma i humor vitri.
4. Relacionar els valors obtinguts per tal d'establir una correlació entre la retinopatia diabètica i la presència de PON 1 i 3 en humor vitri.
5. En aquells malalts que existeixi membrana epiretiniana (MER) idiopàtica o bé secundària a retinopatia diabètica, determinar la presència de PON 1 i 3 i altres elements de estrès oxidatiu en concret 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE), observant les diferències si existeixen entre els dos tipus.



## MATERIAL I MÈTODES

---



## **Disseny**

Estudi tipus sèrie clínica amb recollida de les dades necessàries per l'estudi de tipus prospectiu.

## **Àmbit**

Pacients derivats a l'Hospital Universitari Sant Joan de Reus per a ser intervinguts per retinopatia diabètica, per edema macular diabètic traccional en les seves diferents formes, edema macular diabètic crònic, o bé per presentar forat macular o membrana epiretiniana idiopàtica.

Comarques que en deriven: Baix Camp, Priorat; Ribera d'Ebre, Terra Alta, Montsià (àrea dependent de l'Hospital Comarcal d'Amposta, Conca de Barberà i Alt Camp (àrea dependent del Hospital Pius de Valls) i Tarragonès i Baix Penedès (àrea dependent de l'Hospital Santa Tecla).

## **Subjectes d'estudi**

En total es recolliran mostres en 63 ulls de 63 malalts:

1. Malalts diabètics, en total varen ser 33 ulls de 33 malalts:
  - a) Edema macular diabètic de tipus traccional (bé per tracció vitri-retina o membrana epiretiniana)
  - b) Edema macular diabètic crònic que no respon als tractaments amb intravitries de anti-VEGF o corticoides,
  - c) Malalts amb retinopatia diabètica proliferativa quirúrgica
2. Grup control, per determinar els valors de paraoxonasa PON1 a nivell de vitri o membranes retinianes en aquells malalts sense diabetis mellitus, estarà format per malalts que requereixin vitrectomia per presentar: forat macular o membrana epiretiniana idiopàtica. En total van ser 30 ulls de 30 malalts.

### **Selecció de malalts**

La selecció dels malalts per entrar en l'estudi es va fer de manera aleatòria a partir dels malalts derivats per realitzar vitrectomia per presentar qualsevol de les patologies indicades en el present estudi, com malalts del grup d'estudi o malalts del grup control.

### **Potència d'estudi**

Basant-se en un possible error en la determinació dels nivells de PON1 i PON3 a nivell intraocular, i per obtenir un nivell de significació alfa de 0,05 i una potencia beta de un 95%, es necessiten 50 malalts per l'estudi.

### **Criteris d'exclusió**

- a) Malalts intervinguts en els sis mesos anteriors de qualsevol patologia intraocular (cataractes, glaucoma etc.)
- b) Malalts intervinguts prèviament de vitrectomia
- c) Malalts amb uveïtis anterior o posterior activa o no en l'actualitat
- d) Malalts tractats amb antiinflamatoris inclosos corticoides per via sistèmica per qualsevol causa en els darrers sis mesos
- e) Malalts tractats amb antiinflamatoris inclosos corticoides per via tòpica en els darrers sis mesos
- f) Malalts tractats amb anti-VEGF o corticoides per via intravitria en els darrers sis mesos
- g) Malalts amb glaucoma crònic d'angle obert tractats amb més d'un medicament tòpic
- h) Malalts amb miopia superior a 6 diòptries (miopies mitjana o alta)
- i) Malalts amb altres patologies maculars com DMAE, maculopatia associada a la edat (druses), o altres.

### **Consentiment informat**

Aquest estudi s'ha realitzat després d'haver estat aprovat pel Comitè d'Ètica en Investigacions Científiques locals, obtenint la seva aprovació amb el número de referència: 16-04-28/4actaproj1, amb data 26 de maig de 2011 (Annex).

En la primera visita, el pacient ha estat informat respecte l'objectiu de l'estudi, sol·licitant la seva col·laboració en el mateix tot garantint-li la confidencialitat de les seves dades. Tots els punts anteriorment descrits han estat recollits en el consentiment informat que ha estat signat pel pacient i el metge oftalmòleg responsable de l'estudi.

### **Exploració sistèmica**

En tots els malalts es realitzarà exploració sistèmica que inclourà, examen per part de metge internista, pressa de tensió arterial, petició de les analítiques corresponents.

### **Exploració ocular**

1. Historia clínica oftalmològica complerta
2. Examen de agudes visual amb optotips E de Snellen.
3. Pressa de pressió intraocular amb tonòmetre tipus Goldmann en làmpada de fenedura.
4. Biomicroscòpia de segment anterior. Utilitzant làmpara de fenedura i lent de no contacte de 90 diòptries.
5. Retinografia. En el present estudi s'han realitzat dues retinografies de 50º, una centrada en màcula i l'altra al costat nasal del nervi òptic. L'estudi detingut de les imatges, permet l'observació dels signes que apareixen en l'EMDBT i la RPDBT, ajudant a tipificar-los. D'aquesta manera, la presència de microaneurismes, hemorràgies i exsudats durs en el pol posterior de l'ull, són signes característics de l'EMDBT. Per altra banda, el número d'hemorràgies, la observació d'IRMA's i de tortuositat vascular venosa per quadrants i l'existència de neovascularització retiniana, esdevenen la base per a classificar el grau de retinopatia. S'ha utilitzat el retinògraf TOPCON TRC NW 7SF.
6. Angiografia fluoresceínica, en tots aquells casos que ho han precisat. S'ha utilitzat el retinògraf TOPCON TRC NW 7SF. La tècnica de l'AGF ha consistit en la injecció de 5 cc de fluoresceïna sòdica a través d'una vena del braç, previ la injecció de metoclopramida per a minimitzar les nàusees que pot desencadenar el procediment. Un cop detectada la fluoresceïna a l'ull, s'han començat a prendre imatges angiogràfiques gràcies a la llum verd fluorescent que emet el colorant en ser il·luminant amb llum blava. S'han obtingut imatges dels set camps de 30º de la retina recomanats per l'estudi ETDRS.

7. OCT de retina i de coroides. S'ha explorat l'àrea macular mitjançant el topògraf de coherència òptica (OCT) TOPCON 3D OCT-2000, que permet una resolució axial de 5 µm i una resolució transversal de 20 µm, amb una velocitat de scan de 27.000 scans/segon; la profunditat de focus és de 2,3 mm que possibilita l'exploració de la coroides. La reproductibilitat d'aquest equip té un coeficient de variabilitat inferior al 1%, en les mesures maculars, excepte la medició de la fòvea que té un coeficient del 2,42%, sent per a la medició del gruix macular total del 0,86%.
8. Ecografia ocular en cas de opacitat vítria important que impedia la visualització del Fons d'ull, en aquells casos que ho han precisat s'ha realitzat ecografia Doppler dels vasos que irriguen el globus (artèria oftàlmica, artèria central de la retina, artèries ciliars posteriors).

### **Classificació de la diabetis**

Per a classificar la retinopatia diabètica dels ulls inclosos a l'estudi, s'ha tingut en compte la Classificació Clínica Internacional de la retinopatia diabètica de Wilkinson de l'any 2002, reconeguda per diferents societats com la Acadèmia Americana de Oftalmologia, donada la seva claredat i senzillesa.

En ella, es tipifica la severitat de la RD en 5 graus:

1. No Retinopatia: Absència de lesions, o bé presència de lesions aïllades següents: exsudats cotonosos aïllats, hemorràgies sense microaneurismes. Nivells ETDRS 10, 14 i 15
2. Retinopatia lleu: Microaneurismes, hemorràgies. Nivells ETDRS 20 i 35
3. Retinopatia moderada: Regla 4,2,1; Hemorràgies (en els 4 quadrants), microaneurismes (MA) en 2 quadrants i anomalies intravasculars retinianes (AMIR) en 1 quadrant. Nivell ETDRS 43
4. Retinopatia severa: Presència de qualsevol de (4, 2, 1) i: Més de 20 hemorràgies en els 4 quadrants, o més de 2 rosariaments venosos, o presència de AMIR en més de 1 quadrant. Nivells ETDRS 47 i 53
5. Retinopatia proliferativa: Presència de nevasos. Nivells ETDRS 61 i 65

## **Variables**

Determinació de les següents variables:

1. Dades demogràfiques dels malalts: sexe, edat, raça
2. Dades pròpies de la diabetis mellitus (DM): Edat de diagnòstic, temps de duració de la DM, tipus de tractament de la DM (dieta, antidiabètics orals, insulina), presència de hipertensió arterial (HTA).
3. Dades analítiques generals: HbA1c (valor normal < 7%), perfil lipídic (valorar dislipèmia), proteïna C reactiva
4. Dades analítiques especials:
  - a) activitat paraoxonasa en sèrum/plasma (U/L)
  - b) activitat lactonasa en sèrum/plasma (U/L)
  - c) concentració de PON 1 i 3 en sèrum/plasma (mg/L)
  - d) concentració de PON 1 i 3 en humor vitri i les seves activitats específiques (mg/dl)
  - e) Immunohistoquímica en les membranes retinianes i en el vitri: concentració de paraoxonasa PON1, concentració de 4-hidroxi-nonenal.

## **Recollida i anàlisi de dades**

En els malalts quirúrgics de retinopatia diabètica bé per retinopatia diabètica proliferativa amb tracció vitri-retina, o bé per presència de edema macular diabètic de tipus traccional, es va practicar vitrectomia pars plana de 25 g o 20 g, amb recollida del vitri sota aire que va ser enviat a anatomia patològica en primer terme, igualment la membrana retiniana en el seu cas va ser impregnada amb eosina primer i derivada a anatomia patològica.

En els dos casos (vitri o membrana, en anatomia patològica seran la primera (vitri) sotmesa a centrifugat i el dipòsit enviat a laboratori, en cas de la membrana serà observada sota microscòpia òptica i després inclosa en bloc de parafina i tallada amb micròtom.

Des de anatomia patològica els dos tipus de mostres varen ser enviats al laboratori de investigació on han estat sotmesos a immunohistoquímica per determinar les diferents dades analítiques especials abans esmentades.

Paral·lelament en el preoperatori a més de l'anàlisi habitual s'extrauran les mostres suficients per determinar en sèrum / plasma les dades analítiques especials abans esmentades.

### **Estudi de les membranes retinianes estretes**

Les membranes van ser classificades en dos graus, assistint al Blue Mountain Eye Study:

Grau 1: anomenat reflex cel·lular macular, que es descriu com un reflex lluminós, d'aigua, seda i llum.

Grau 2: denominat fibrosi macular preretinal, en aquest cas la membrana es espessa i es contreu, amb les línies de tracció de la superfície, amb aspecte opac o gris.

Tots els nostres casos són del segon grau, ja que és la forma que afecta la visió amb una disminució de l'agudeses visual inferior a 0,4 i produeix metamorfopsia.

La diferència entre MER idiopàtica o secundària a diabetis, es va fer tenint en compte els següents paràmetres:

1. Es considera MER idiopàtica la desenvolupada en malalts no diabètics i que presenten una monocapa cel·lular formada per cèl·lules gials o epitelials.
2. Es considera MER secundària si el malalt té diabetis mellitus i a més hi han signes de retinopatia diabètica. Estan formades per una multicapa cel·lular juntament amb altres tipus de cèl·lules, com cèl·lules inflamatòries.

### **Anàlisi estadístic**

Totes les anàlisis estadístiques es van realitzar amb el programa estadístic SPSS 21.0. El grau de significació mínima es va establir a  $P \leq 0.05$  a cada test.

Es van utilitzar mètodes estàndard (Kolmogorov-Smirnov i Shapiro-Wilks) per comprovar si les variables seguien una distribució normal.

Es varen fer determinacions de les freqüències i estudi descriptiu dels malalts inclosos en la mostra, tan del grup d'estudi com del grup control, respecte a les variables demogràfiques, variables pròpies de la diabetis mellitus, dels diferents tipus de retinopatia que presenten, i de les dades obtingudes en els anàlisis dels paràmetres estudiats (entre ells està la determinació de la PON1 i PON3)

Determinació de les diferències entre el grup control i el grup estudiat respecte a les variables quantitatives següents:

### Variabes derivades de l'estudi de la paraoxonasa:

1. activitat paraoxonasa en sèrum (U/L)
2. activitat lactonasa en sèrum (U/L)
3. concentració de PON1 i PON3 en sèrum (mg/L)
4. concentració de PON1 i PON3 en humor vitri i les seves activitats específiques (mg/dl)

### Variabes demogràfiques i pròpies de la diabetis mellitus en el grup estudi:

1. edat
2. pes (kg)
3. talla (cm)
4. índex de massa corporal (IMC)
5. HbA1c
6. creatinina en sèrum (mg / dl)
7. urea en sèrum (mg/dl)
8. filtrat glomerular en sèrum, glucosa en sèrum (mg / dl)

Les diferències entre dos grups es van analitzar amb el test *t*-Student (paramètric) o amb el test U-Mann-Whitney (no paramètric). Les diferències entre múltiples grups es van analitzar amb l'ANOVA.

Per l'estudi de les variables qualitatives com les derivades de la pròpia diabetis mellitus o la presència de retinopatia diabètica l'estudi univariant es farà amb l'aplicació de l'estadígraf Chi quadrat.

Per avaluar el grau d'associació entre dues variables es van utilitzar els coeficients de correlació de Pearson (paramètric) i Spearman (no paramètric) o el test de Kruskal Wallis (categòric).

### **Limitacions de l'estudi**

Les limitacions del present estudi vindran determinades per el número de malalts inclosos en la mateixa en primer terme. Una segona limitació es que els malalts inclosos son malalts diabètics amb indicació quirúrgica, per tan aquells malalts diabètics amb retinopatia però sense indicació quirúrgica no es podrà exportar el resultats de manera immediata.



## RESULTATS

---



---

## MOSTRA

### 1. Descripció de la mostra

- 63 ulls de 63 pacients, amb una edat mitja de 71 anys (44,6-81), dels quals un 29% eren homes i 34% dones. Els nombre de malalts amb diabetis era 33, dels quals 5 tenien diabetis tipus 1 i la resta de 28 tenien diabetis tipus 2, i els ulls no diabètics eren 30 (**Taula 4**).

- Els motius d'intervenció quirúrgica dels ulls afectats van ser: en 11 ulls (17,5%) per extracció de membrana epiretinana (MER), en 4 ulls (6,3%) per luxació del cristal·lí, en 8 ulls (12,7% ) per vitrectomia per edema macular traccional, en 14 ulls (22,3%) per desprendiment de retina, en 2 ulls (3,2%) per luxació de lent intraocular (LIO), a 18 ulls (28,6%) per hemovítri i en 4 ulls (6,3%) per forat macular. Només 15 (23,8%) ulls havien rebut tractament amb làser argó previ (**Taula 4**).

- Dins el grup ulls de pacient amb diabetis hi havia 3 ulls (4,8%) amb retinopatia diabètica lleu, 14 ulls (22,2%) amb retinopatia diabètica moderada i 16 ulls(25,4%) amb retinopatia diabètica greu. D'aquests 33 ulls de pacients diabètics n'hi havia 20 (31,74%) que es tractaven amb insulina (**Taula 4**).

- Els ulls que presentaven hemorràgia vítria eren 18 (28,6%), dels quals tots eren diabètics menys un (**Taula 4**).

### 2. Estudi estadístic de la mostra

La mostra inclou ulls de pacients diabètics (grup casos) i no diabètics (grup control). No es van trobar diferències significatives dependents del sexe, ni per edat, ni per presència d'HTA, ni per IMC.

	<b>VARIABLE (V)</b>	<b>Pacients (%)</b>
Sexe	Home	29 (46)
	Dona	34 (54)
Diabetis Mellitus	Sí	32 (50,8)
	No	31(49,2)
Presència de HV	Sí	19 (30,2)
	No	44 (69,8)
Patologia Retina prèvia	No	57 (90,5)
	DMAE	2 (3,2)
	RPDBT	1 (1,6)
	DR + oli silicona	3 (4,8)
Patologia quirúrgica	MER	11 (17,5)
	LC	4 (6,3)
	EMDT	8 (12,7)
	DR	11 (17,5)
	DR + oli	3 (4,8)
	LLIO	2 (3,2)
	HV	18 (28,6)
	FM	4 (6,3)
	Endoftalmitis	2 (3,2)
Tractament amb ADO	No diabètic	30 (47,61)
	Sí	25 (39,68)
	No	8 (12,6)
Tractament amb Insulina	No diabètic	30 (47,61)
	Sí	20 (31,74)
	No	13 (20,63)
Grau retinopatia diabètica	No	30 (47,6)
	Lleu	3 (4,8)
	Moderada	14 (22,2)
	Proliferativa	16 ( 25,4)
Diabètic Tipus	No DBT	30 (47,6)
	Tipus 1	5 (7,9)
	Tipus 2	28(44,4)
Injeccions prèvies	Sí	2 (3,17)
	No	61 (96,8)
Làser retina previ	Sí	15 (23,8)
	No	48 (76,2)
HTA	Sí	32 ( 52,5)
	No	29 (47,5)
DSLPM	Sí	25 (41)
	No	36 (59)
Vasculopatia diabètica	No diabètic	31 (50,8)
	Sí	8 (13,1)
	No	22 (36,1)
Neuropatia diabètica	No diabètic	31 (50,8)
	Sí	3 (4,9)
	No	27 (44,3)
Nefropatia diabètica	No diabètic	31 (50,8)
	Sí	8 (63,9)
	No	22 (36,1)

**Taula 4.** Variables qualitatives estudiades. ADO: antidiabètics orals, HTA: hipertensió arterial, DSLPM: dislipèmia, DMAE: degeneració macular associada a l'edat, RD: retinopatia diabètica, DR: desprendiment de retina, MER: membrana

epiretinana, LC: luxació de cristal·lí, EMDT: edema macular diabètic traccional, LLIO: luxació lent intraocular, HV:

hemovitri, FM: forat macular

Variable	Mediana (percentil entre el 5 i 95 %)
Activitat Paraoxonasa Sèrum (U/L)	136,7 (108,2-208,2)
Activitat Lactonasa Sèrum (U/L)	6,1 (3,4- 9,2)
Concentració PON 1 Sèrum (mg/L)	211,31 (16,59-557,62)
Concentració PON3 Sèrum (mg/L)	9,15 (5,8-17,7)
Concentració PON1 humor vitri	0,02 (0,001- 0,33)
Concentració PON3 humor vitri	1,21 (0,19-16,0)
Edat pacient (anys)	71 (44,6- 81,0)
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	29,75 (23,6-39,84)
Creatinina Sèrum (mg/dL)	0,84 (0,49-2,28)
Urea Sèrum (mg/dL)	37 (22,7-74,0)
Filtrat Glomerular Sèrum	45 (77,39-30,4)
Glucosa Sèrum (mg/dL)	109 (79-244,20)
HbA1c (%)	7,5 (5,9-13,4)
Pes (kg)	81,5 (55,5-105,0)
Talla (cm)	163 (147,9-177,4)
Activitat específica Paraoxonasa (U/mg)	0,73 (0,26-8,50)
Activitat específica lactonasa (U/mg)	0,02 (0,009-0,48)

Taula 5. Variables quantitatives estudiades

## ESTUDI PON

### 1. Estudi de les variables PON1 i PON3 a sèrum/plasma entre els següents subgrups:

#### a) Comparació de mostra de ulls diabètics i no diabètics

PON 1 en sèrum/plasma	Diabètic (N=24)	No diabètic (N=19)
Mitjana	207,24 +/-148,21 (144,65-269,83)	173,99+/- 90,17 (130,53-217,45)
Mediana	182,37	162,97

=> Els resultats surten significatius amb una significació estadística  $p = 0,013$

PON 1 en sèrum /plasma (mg/L)

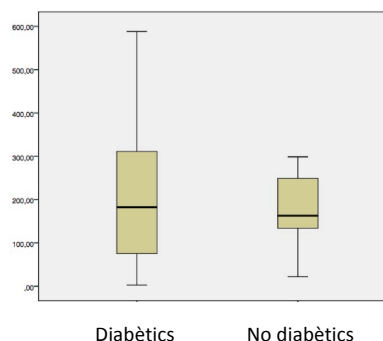
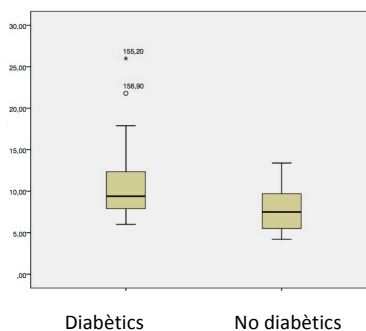


Figura 24. Representació gràfica dels valors de mitjana i mediana dels valors de PON1 en sèrum/plasma (mg/L) al comparar pacients diabètics i no diabètics de la mostra.

PON 3 en sèrum/plasma	Diabètic (N=24)	No diabètic (N=19)
Mitjana	11,18 +/- 5,10 (9,02-13,33)	7,68 +/- 2,65 (6,40-8,97)
Mediana	9,40	7,50

=> El resultat surten significatius amb una significació estadística  $p=0,042$

PON 3 en sèrum /plasma (mg/L)



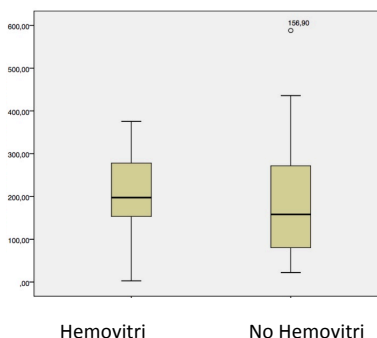
**Figura 25.** Representació gràfica dels valors de mitjana i mediana dels valors de PON3 en sèrum/plasma (mg/L) al comparar ulls diabètics i no diabètics.

b) Comparació de mostra de ulls amb presència de hemorràgia vítria i sense hemorràgia vítria

PON1 en sèrum/plasma	Mostra amb hemovítiri (N=13)	Mostra sense hemovítiri (N=30)
Mitjana	197,34 +/- 122,89 (123,07-271,60)	190,47 +/- 128,88 ( 142,35-238,60)
Mediana	197,47	193,42

=> Les diferències no són significatives estadísticament

PON 1 en sèrum /plasma (mg/L)

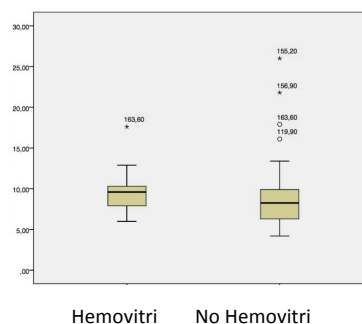


**Figura 26.** Representació gràfica dels valors de mitjana i mediana dels valors de PON1 en sèrum/plasma (mg/L) al comparar ulls amb hemorràgia vítria i sense hemorràgia vítria.

PON3 en sèrum/plasma	Mostra amb hemovitri (N=13)	Mostra sense hemovitri (N=30)
Mitjana	8,82 +/- 2,97 (0 - 3,79)	9,64 +/- 5,07 ( 7,64-11,43)
Mediana	9,60	8,25

=> Les diferències no són significatives estadísticament

PON 3 en sèrum /plasma (mg/L)



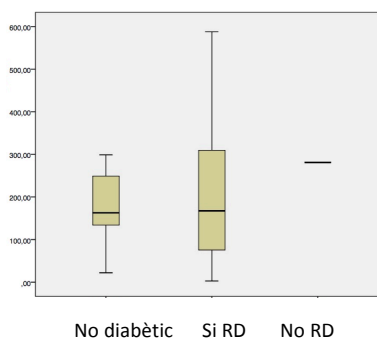
**Figura 27.** Representació gràfica dels valors de mitjana i mediana dels valors de PON3 en sèrum/plasma (mg/L) al comparar ulls amb hemorràgia vítria i sense hemorràgia vítria.

c) Mostra d'ulls amb presència de retinopatia diabètica i sense retinopatia diabètica i ulls no diabètics

PON 1 en sèrum/plasma	Mostra amb retinopatia diabètica (N=23)	Mostra sense retinopatia diabètica (N=20)
Mitjana	204,03 +/-150,69 (138,86-269,19)	173,99 +/- 90,17 (130,53-217,45)
Mediana	167,28	162,97

=> Les diferències no són significatives estadísticament

PON 1 en sèrum /plasma (mg/L)

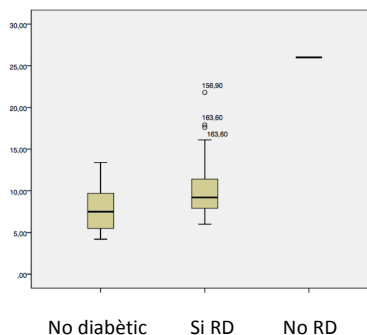


**Figura 28.** Representació gràfica dels valors de mitjana i mediana dels valors de PON1 en sèrum/plasma (mg/L) al comparar ulls amb presència de retinopatia diabètica, no retinopatia diabètica i ulls de pacients no diabètics.

PON3 en sèrum/plasma	Mostra amb retinopatia diabètica (N=23)	Mostra sense retinopatia diabètica (N=19)
Mitjana	10,53 +/- 4,09 (8,76-12,31)	10,61 +/- 2,65 (6,40-8,97)
Mediana	9,20	7,50

=> Les diferències no són significatives estadísticament

PON3 en sèrum /plasma (mg/L)



**Figura 29.** Representació gràfica dels valors de mitjana i mediana dels valors de PON3 en sèrum/plasma (mg/L) al comparar ulls amb presència de retinopatia diabètica, no retinopatia diabètica i ulls de pacients no diabètics

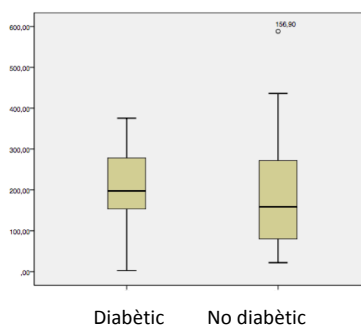
## 2. Estudi de l'activitat paraoxonasa i lactonasa en sèrum/plasma

a) Comparació de mostra de ulls diabètics i no diabètics

Activitat Paraoxonasa en sèrum	Diabètic (N=25)	No diabètic (N=19)
Media	144,85 +/- 28,73 ( 132,99-156,71)	140,30 +/- 28,94 (127,47-153,13)
Mediana	138,40	135,00

=> Les diferències no són significatives estadísticament

Activitat Paraoxonasa en sèrum (U/L)

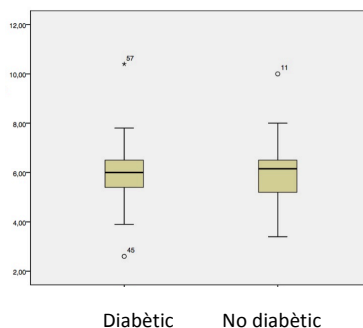


**Figura 30.** Representació gràfica dels valors de mitjana i mediana de l'activitat Paraoxonasa en sèrum (U/L) al comparar ulls de pacients amb diabètics i no diabètics

Activitat Lactonasa en sèrum	Diabètic (N=25)	No diabètic (N=22)
Mitjana	5,92 +/- 1,48 ( 5,31-6,53)	5,97 +/- 1,47 (5,32-6,62)
Mediana	6,00	6,15

=> Les diferències no són significatives estadísticament

Activitat Lactonasa en sèrum (U/L)



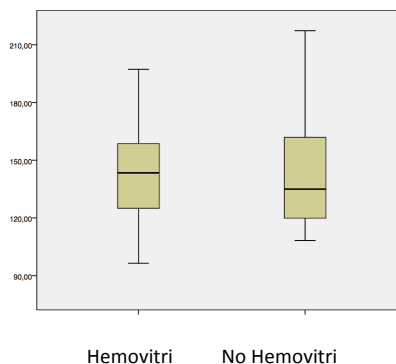
**Figura 31.** Representació gràfica dels valors de mitjana i mediana de l'activitat Lactonasa en sèrum (U/L) al comparar ulls de pacients amb diabètics i no diabètics

b) Comparació de mostra de ulls amb presència de hemorràgia vítria i sense hemorràgia vítria

Activitat Paraoxonasa en sèrum	Mostra amb hemovítri (N=13)	Mostra sense hemovítri (N=34)
Mitjana	144,35 +/-29,03 (126,80-161,89)	142,10+/- 28,85 (132,03-152,17)
Mediana	143,40	135,00

=> Les diferències no són significatives estadísticament

Activitat Paraoxonasa en sèrum (U/L)

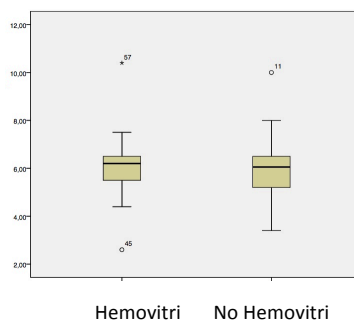


**Figura 32.** Representació gràfica dels valors de mitjana i mediana de l'activitat Paraoxonasa en sèrum (U/L) al comparar ulls de pacients amb hemovítri i sense hemovítri

Activitat Lactonasa en sèrum	Mostra amb hemovitri (N=13)	Mostra sense hemovitri (N=34)
Mitjana	5,49 +/- 1,78	5,90 +/- 1,34 (5,42-6,37)
Mediana	6,20	6,05

=> Les diferències no són significatives estadísticament

Activitat Lactonasa en sèrum (U/L)



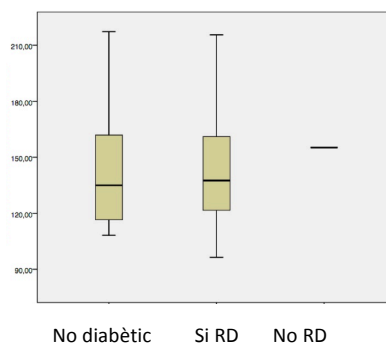
**Figura 33.** Representació gràfica dels valors de mitjana i mediana de l'activitat Lactonasa en sèrum (U/L) al comparar ulls de pacients amb hemovíttri i sense hemovíttri

c) Mostra d'ulls amb presència de retinopatia diabètica, sense retinopatia diabètica i ulls no diabètic

Activitat Paraoxonasa en sèrum	Mostra amb retinopatia diabètica (N=24)	Mostra sense retinopatia diabètica (N=23)
Mitjana	144,42 +/-29,26 (132,00-156,78)	140,30 +/- 28,94 (127,47-153,13)
Mediana	137,55	135,00

=> Les diferències no són significatives estadísticament

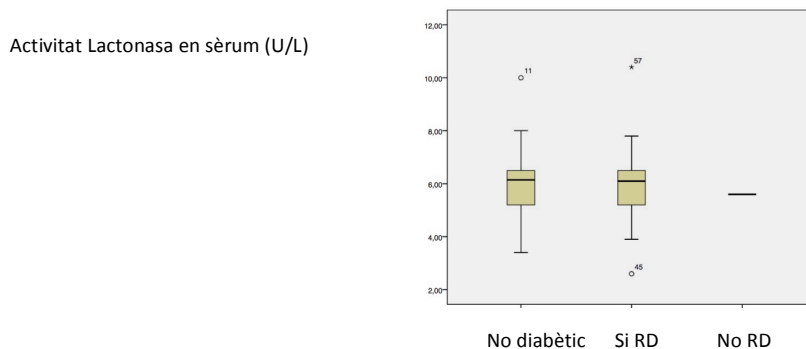
Activitat Paraoxonasa en sèrum (U/L)



**Figura 34.** Representació gràfica dels valors de mitjana i mediana de l'activitat Paraoxonasa en sèrum (U/L) al comparar ulls de pacients amb retinopatia diabètica, sense retinopatia diabètica i no diabètics

Activitat Lactonasa en sèrum	Mostra amb retinopatia diabètica (N=24)	Mostra sense retinopatia diabètica (N=23)
Mitjana	5,93 +/- 1,51(5,29-6,57)	5,31 +/-1,47 (5,32-6,62)
Mediana	6,10	76,70

=> Les diferències no són significatives estadísticament



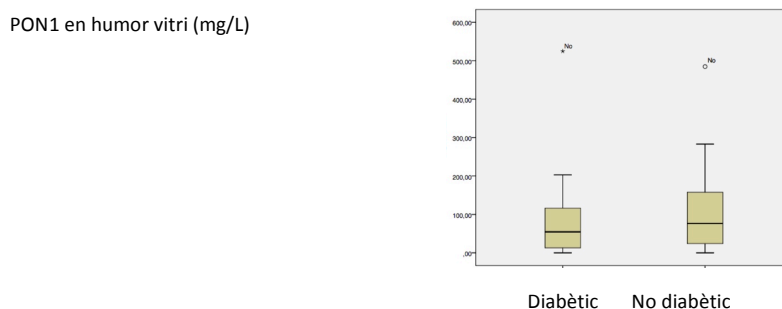
**Figura 35.** Representació gràfica dels valors de mitjana i mediana de l'activitat Lactonasa en sèrum (U/L) al comparar ulls de pacients amb retinopatia diabètica, sense retinopatia diabètica i no diabètics

### 3. Estudi de PON 1 i PON 3 en humor vitri

a) Comparació de mostra de ulls diabètics i no diabètics

PON 1 en Humor vitri	Diabètic (N=28)	No diabètic (N=27)
Mitjana	82,53+/-105,19 ( 41,74-123,32)	102,61+/- 109,68 (59,22-146,00)
Mediana	54,40	76,70

=> Les diferències no són significatives estadísticament

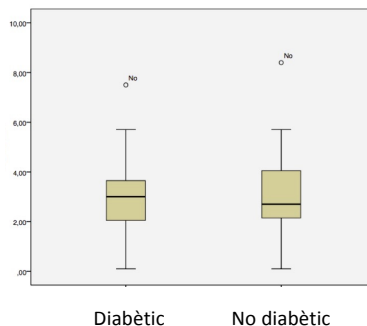


**Figura 36.** Representació gràfica dels valors de mitjana i mediana dels valors de PON1 en humor vitri en ulls de pacients diabètics i no diabètics

PON 3 en Humor vitri	Diabètic (N=28)	No diabètic (N=27)
Mitjana	3,03+/-1,41 (2,49-3,58)	3,18+/-1,70 (2,51-3,58)
Mediana	3,00	2,70

=> Les diferències no són significatives estadísticament

PON3 en en humor vitri (mg/L)



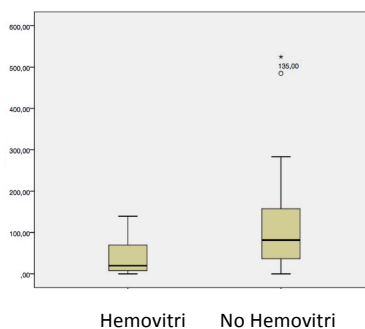
**Figura 36.** Representació gràfica dels valors de mitjana i mediana dels valors de PON3 en humor vitri en ulls de pacients diabètics i no diabètics

b) Comparació de mostra de ulls amb presència de hemorràgia vítria i sense hemorràgia vítria

PON 1 en Humor vitri	Mostra amb hemovitri (N=16)	Mostra sense hemovitri (N=39)
Mitjana	42,52+/-47,00 (17,74-67,57)	112,85+/- 117,85 (74,64-151,05)
Mediana	19,80	81,70

=> Les diferències no són significatives estadísticament

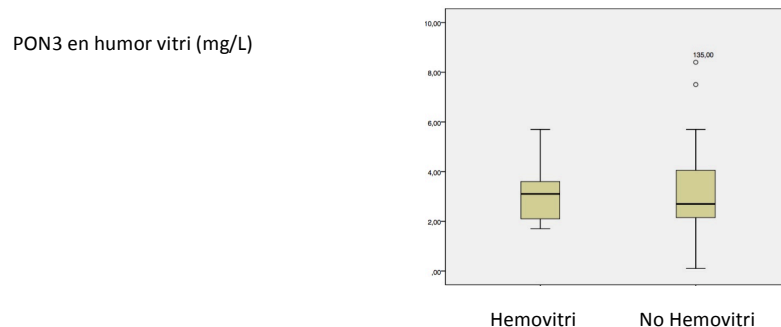
PON1 en humor vitri (mg/L)



**Figura 37.** Representació gràfica dels valors de mitjana i mediana dels valors PON1 en humor vitri en ulls de amb hemovitri i sense hemovitri.

PON 3 en Humor vitri	Mostra amb hemovitri (N=16)	Mostra sense hemovitri (N=39)
Mitjana	5,66+/-1,08 (2,45-3,60)	3,15+/- 1,71 (2,58-3,70)
Mediana	2,95	2,70

=> Les diferències no són significatives estadísticament

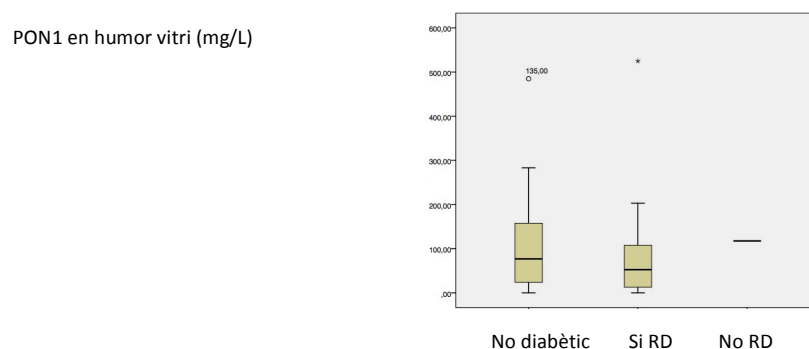


**Figura 38.** Representació gràfica dels valors de mitjana i mediana dels valors de PON3 en humor vitri en ulls de amb hemovitri i sense hemovitri.

c) Mostra d'ulls amb presència de retinopatia diabètica, sense retinopatia diabètica i ulls no diabètics

PON 1 en Humor vitri	Mostra amb retinopatia diabètica (N=27)	Mostra sense retinopatia diabètica (N=28)
Mitjana	81,22 +/- 106,95 (38,91-123,54)	102,61 +/-109,68 (59,22-146,00)
Mediana	52,40	76,70

=> Les diferències no són significatives estadísticament

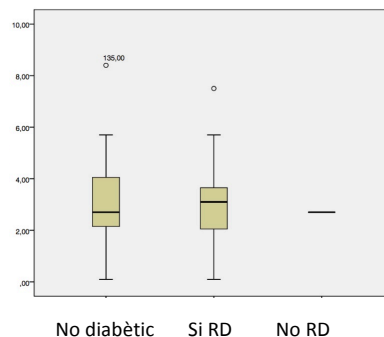


**Figura 39.** Representació gràfica dels valors de mitjana i mediana dels valors de PON1 en humor vitri en ulls de pacients amb retinopatia diabètica, sense retinopatia diabètica i no diabètics.

PON 3 en Humor vitri	Mostra (N=27)	Mostra sense retinopatia diabètica (N=28)
Mitjana	3,05 +/- 1,43 (2,48-3,62)	3,18 +/- 1,70(2,51-3,85)
Mediana	3,10	2,70

=> Les diferències no són significatives estadísticament

PON3 en humor vitri (mg/L)



**Figura 40.** Representació gràfica dels valors de mitjana i mediana dels valors PON3 en humor vitri en ulls de pacients amb retinopatia diabètica, sense retinopatia diabètica i no diabètics.

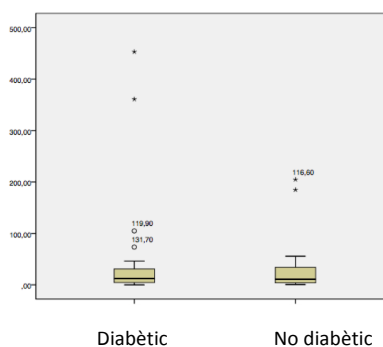
#### 4. Estudi de l'activitat de PON1 i PON3 en humor vitri

##### a) Comparació de mostra d'ulls diabètics i no diabètics

Activitat PON 1 en Humor vitri	Diabètics (N=25)	No diabètics (N=24)
Mitjana	50,78 +/- 110,75 (5,06-96,49)	31,48 +/- 53,20 (9,01-53,94)
Mediana	12,10	11,00

=> Les diferències no són significatives estadísticament

Activitat PON 1 en humor vitri (U/mg)



**Figura 41.** Representació gràfica dels valors de mitjana i mediana de l'activitat de PON1 en humor vitri en els ulls de pacients diabètics i no diabètics.

Activitat PON 3 en Humor vítri	Diabètics (N=25)	No diabètics (N=24)
Mitjana	2,64 +/- (0,93-4,35)	2,28 +/- 2,55 (1,20-3,36)
Mediana	1,15	1,29

=> Les diferències no són significatives estadísticament

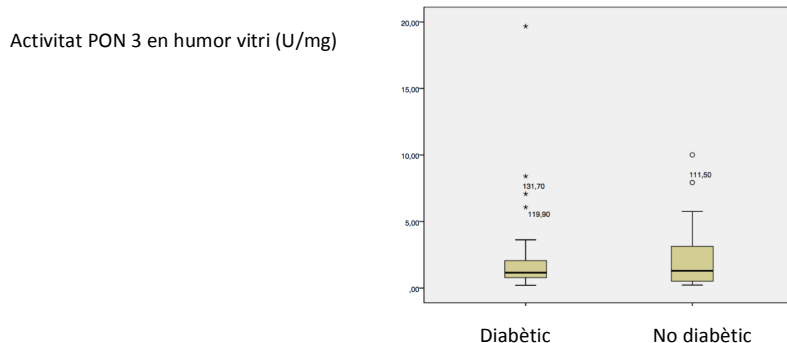


Figura 42. Representació gràfica dels valors de mitjana i mediana de l'activitat de PON3 en humor vítri en els ulls de pacients diabètics i no diabètics.

b) Comparació de mostra d'ulls amb presència de hemorràgia vítria i sense hemorràgia vítria

Activitat PON 1 en Humor vítri	ulls amb hemorràgia vítria (N=19)	ulls sense hemorràgia vítria (N=44)
Mitjana	33,39 +/- 87,94 (-13,47 - 80,25)	45,17 +/- 87,77 ( 14,05 - 76,30)
Mediana	10,75	11,20

=> Les diferències no són significatives estadísticament

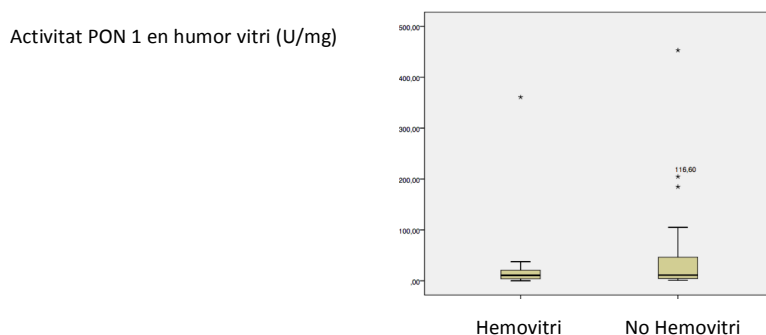
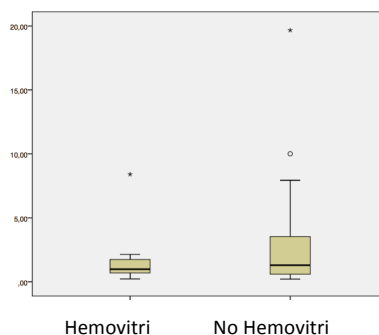


Figura 43. Representació gràfica dels valors de mitjana i mediana de l'activitat de PON 1 en humor vítri en ulls amb hemovítri i sense hemovítri.

Activitat PON 3 en Humor vitri	ulls amb hemorràgia vítria (N=19)	ulls sense hemorràgia vítria (N=44)
Mitjana	0,47 +/-1,91	2,90 +/-3,90 (1,52-4,29)
Mediana	0,98	1,30

=> Les diferències no són significatives estadísticament

Activitat PON 3 en humor vitri (U/mg)



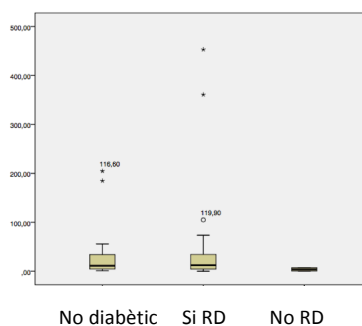
**Figura 44.** Representació gràfica dels valors de mitjana i mediana de l'activitat de PON 3 en humor vitri en ulls amb hemovitri i sense hemovitri.

c) Mostra d'ulls amb presència de retinopatia diabètica, sense retinopatia diabètica i ulls no diabètics

Activitat PON 1 en Humor vitri	ulls amb retinopatia diabètica (N=24)	ulls sense retinopatia diabètica (N=23)
Mitjana	52,60 +/- 112,74 (4,99-100,21)	32,83 +/- 53,97 (9,48-56,17)
Mediana	12,45	11,20

=> Les diferències no són significatives estadísticament

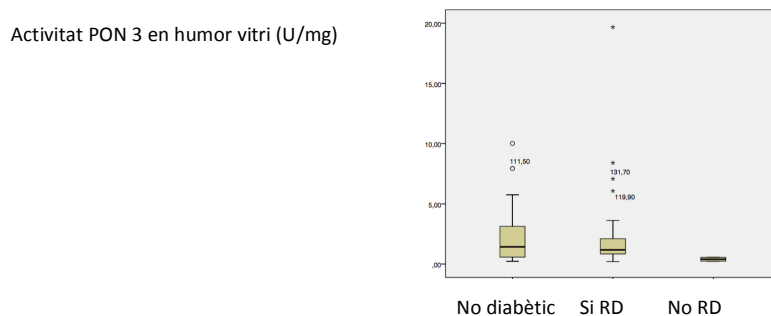
Activitat PON 1 en humor vitri (U/mg)



**Figura 45.** Representació gràfica dels valors de mitjana i mediana de l'activitat de PON 1 en humor vitri en ulls de pacients amb retinopatia diabètica, sense retinopatia diabètica i no diabètics.

Activitat PON 3 en Humor vitri	ulls amb retinopatia diabètica (N=24)	ulls sense retinopatia diabètica (N=23)
Mitjana	2,73 +/- 4,20 (0,92-4,50)	2,37 +/- 2,57 (1,25-3,48)
Mediana	1,18	1,42

=> Les diferències no són significatives estadísticament



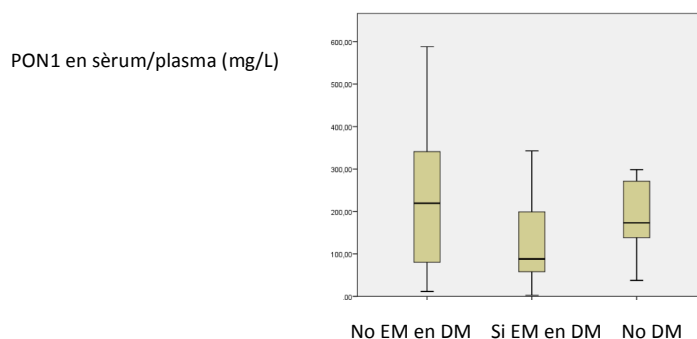
**Figura 46.** Representació gràfica dels valors de mitjana i mediana de l'activitat de PON 3 en humor vitri en ulls de pacients amb retinopatia diabètica, sense retinopatia diabètica i no diabètics.

## 5. Estudi del subgrup amb edema macular diabètic

### a) Estudi PON1 i PON3 en sèrum/plasma

PON 1 en sèrum/plasma	Ulls sense edema macular en pacients diabètics (N=26)	Ulls amb edema macular en pacients diabètics (N=8)	Ulls de pacients no diabètics (N=29)
Mitjana	210,35 +/- 75,00	135,71 +/- 32,23	210,70 +/- 22,46
Mediana	221,10	92,35	186,40

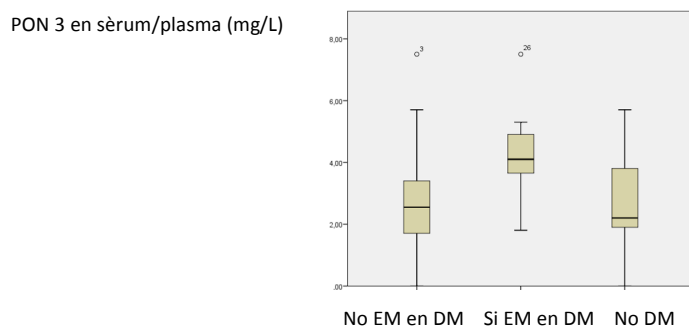
=> Les diferències no són significatives estadísticament



**Figura 47.** Representació gràfica dels valors de mitjana i mediana dels valors de PON 1 en sèrum/plasma en els ulls sense edema macular de pacients diabètics, ulls amb edema macular de pacients diabètics i ulls de pacients no diabètics.

PON 3 en sèrum/plasma	Ulls sense edema macular en pacients diabètics (N=26)	Ulls amb edema macular en pacients diabètics (N=8)	Ulls de pacients no diabètics (N=29)
Mitjana	2,67 +/- 1,57	4,32 +/- 1,62	2,57 +/- 1,43
Mediana	2,55	4,10	2,20

=> Les diferències no són significatives estadísticament

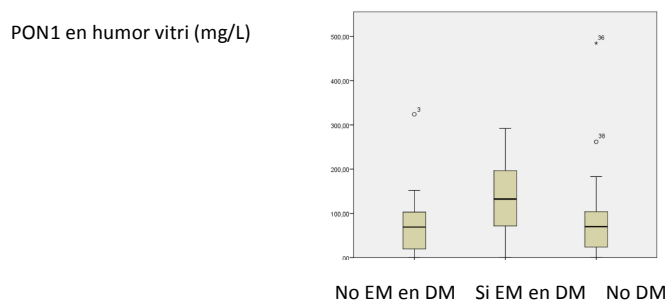


**Figura 48.** Representació gràfica dels valors de mitjana i mediana dels valors de PON 3 en sèrum/plasma en els ulls sense edema macular de pacients diabètics, ulls amb edema macular de pacients diabètics i ulls de pacients no diabètics.

#### b) Estudi PON1 i PON3 en humor vitri

PON 1 en humor vitri	Ulls sense edema macular de pacients diabètics (N= 21)	Ulls amb edema macular de pacients diabètics (N= 8)	Ulls de pacients no diabètics (N= 27)
Mitjana	76,81 +/- 75,00	136,61 +/- 92,49	90,70 +/- 102,46
Mediana	69,10	132,35	70,10

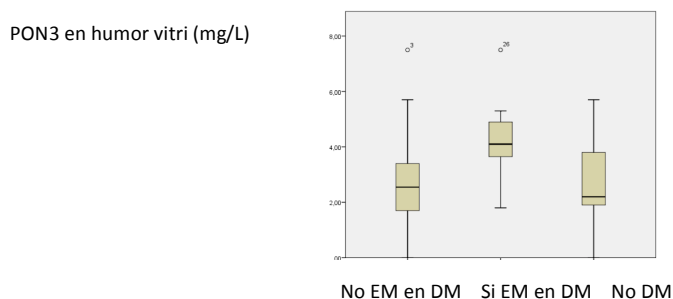
=> Els resultats surten significatius amb una significació estadística p=0,02



**Figura 49.** Representació gràfica dels valors de mitjana i mediana dels valors de PON 1 en humor vitri en els ulls amb edema macular diabètic i sense edema macular diabètic.

PON 3 en humor vitri	Ulls sense edema macular de pacients diabètics (N= 26)	Ulls amb edema macular de pacients diabètics (N= 8)	Ulls de pacients no diabètics (N=29)
Mitjana	2,67 +/- 1,57	4,32 +/- 1,62	2,57 +/- 1,60
Mediana	2,55	4,10	2,60

=> Els resultats surten significatius amb una significació estadística  $p=0,01$

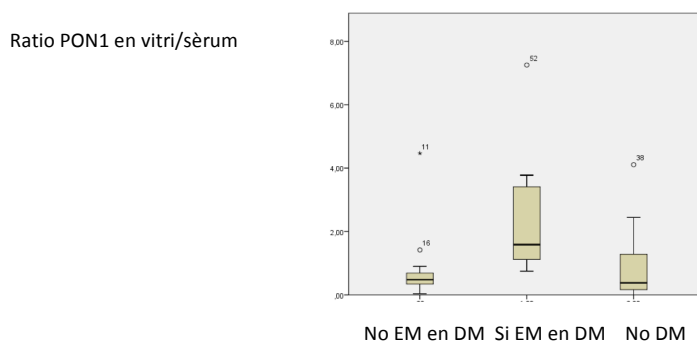


**Figura 50.** Representació gràfica dels valors de mitjana i mediana dels valors de PON 3 en humor vitri en els ulls amb edema macular diabètic i sense edema macular diabètic

c) Estudi ratio PON1 i PON3 en vitri/sèrum

Ratio PON1 vitri/sèrum	Ulls sense edema macular en pacients diabètics (N=24)	Ulls amb edema macular diabètic en pacients diabètics (N= 8)
Mitjana	0,66 +/- 0,17	2,52 +/- 2,17

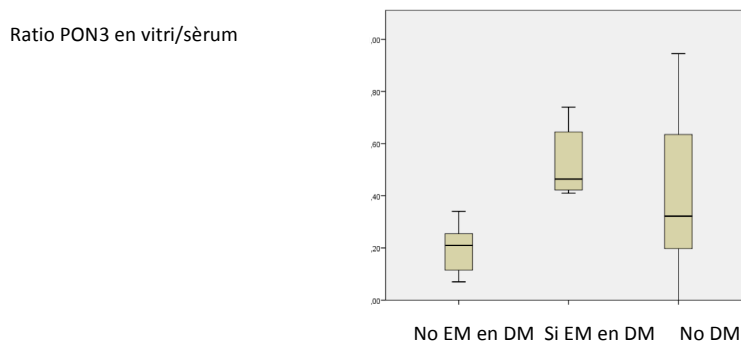
=> Els resultats surten significatius amb una significació estadística  $p=0,003$



**Figura 51.** Representació gràfica dels valors de mitjana i mediana de la ratio PON 1 en vitri/sèrum en ulls de pacients sense edema macular en pacients no diabètics, ulls amb edema macular en pacients diabètics i ulls de pacients no diabètics.

Ratio PON3 vitri/sèrum	Ulls sense edema macular en pacients diabètics (N= 24)	Ulls amb edema macular en pacients diabètics (N= 8)
Mitjana	19 +/- 0,08	0,52 +/- 0,12

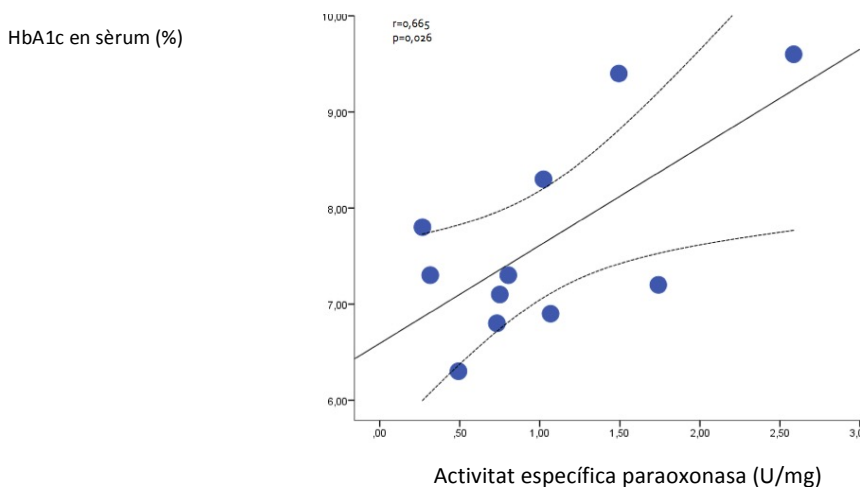
=> Els resultats surten significatius amb una significació estadística  $p=0,025$



**Figura 52.** Representació gràfica dels valors de mitjana i mediana de la ratio PON 3 en vitri/sèrum en ulls de pacients sense edema macular en pacients no diabètics, ulls amb edema macular en pacients diabètics i ulls de pacients no diabètics.

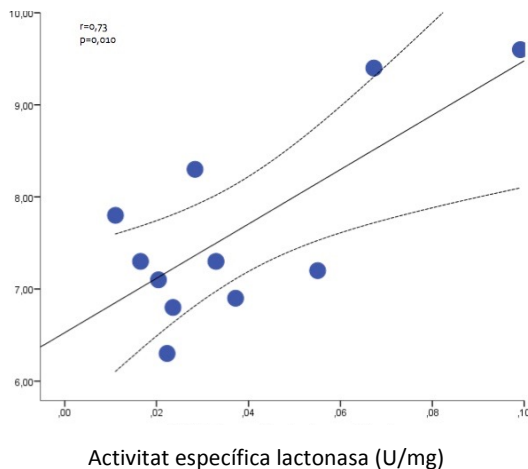
## 6) Estudi de correlació

Les gràfiques de correlació van mostrar resultats estadísticament significatius en la població diabètica, on es va trobar una  $r=0,665$  entre els valors d'HbA1c i l'activitat específica paraoxonasa, i una  $r=0,73$  entre els valors l'HbA1c i l'activitat específica lactonasa. (Figures 53 i 54)



**Figura 53.** Gràfica de correlació positiva entre HbA1c i l'activitat específica paraoxonasa en els pacients diabètics

HbA1c en sèrum (%)



**Figura 54.** Gràfica de correlació positiva entre HbA1c i l'activitat específica lactonasa en els pacients diabètics

## ESTUDI MEMBRANES RETINIANES

### a) Estudi demogràfic de la mostra i estudi de tomografia de coherència òptica (OCT)

La **Taula 10** mostra les dades demogràfiques de la mostra. S'estudien 10 de les 11 membranes extretes, ja que en una no hi havia suficient material per analitzar. No hi ha diferències de gènere entre grups. L'edat mitjana va ser de  $74,60 \pm 3,45$  (66-76) anys per a les MER diabètiques secundàries i de  $72,40 \pm 3,91$  (70-78) anys per a les MER idiopàtiques. No hi va haver diferències estadístiques entre els dos grups d'edat mitjana ( $p=0,372$ ). La retinopatia diabètica estava present en tots els casos de MER diabètiques secundàries. Es va observar un desprendiment vitri posterior en dos casos de MER secundàries diabètiques, i en tots els casos amb MER idiopàtiques. L'agudeses visual tenia una mitjana preoperatòria de  $0,18 \pm 0,08$  (0,1-0,3) en MER amb retinopatia diabètica secundària i una mitjana de  $0,2 \pm 0,07$  (0,1-0,3) en MER idiopàtiques. La mitjana postoperatòria de l'agudeses visual va augmentar en tots els casos, excepte en el cas número tres a causa del pacient presentant una retinopatia diabètica proliferativa amb membrana neovascular papil·lar i àrees focals d'isquèmia macular, demostrades per l'angiografia fluoresceínica. L'agudeses visual mitjana postoperatòria va ser de  $0,42 \pm 0,2$  (0,1-0,6) en MER de retinopatia diabètica secundària i una mitjana de  $0,56 \pm 0,15$  (0,4-0,8) en MER idiopàtiques. Malgrat l'augment en ambdós grups, les diferències en l'agudeses visual van augmentar entre elles,

però no van ser estadísticament significatives a la prova de t no separada de dues dades en  $p = 0,195$ .

Malalt	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Etiologia MER	Secundària a diabetis					Idiopàtica				
Edat	73	75	66	72	76	77	78	76	70	72
Sexe	H	D	H	H	D	D	H	D	H	H
Ull	esq	dret	esq	esq	dret	dret	esq	esq	dret	dret
AV preoperatòria	0.1	0.2	0.1	0.2	0.3	0.2	0.3	0.2	0.1	0.2
AV postoperatòria	0.4	0.6	0.1	0.4	0.6	0.6	0.8	0.5	0.5	0.4
Diabetis mellitus	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	No	No	No	No	No
Retinopatia diabètica	Sí (RD severa)	Sí (RD moderada)	Sí (RD proliferativa)	Sí (RD moderada)	Sí (RD moderada)	No	No	No	No	No
OCT tipus	C	E	C	C	E	E	E	E	E	E
OCT gruix (nm)	392	377	332	387	415	315	320	321	312	331

**Taula 10.** Dades demogràfiques: RDNP = Retinopatia diabètica no proliferativa; RD = retinopatia diabètica; OCT = Tomografia de coherència òptica; C= Cístic; E= espongiforme; H= home; D= dona; Esq= esquerre; MER= membrana epiretinana

En l'estudi mitjançant OCT el tipus d'edema macular era espongiforme en tots els casos de la mostra d'ERMs idiopàtics i dos casos amb ERM diabètics secundaris, es va observar forma quística en tres casos de ERM diabètics secundaris. La mitjana de l'edema macular era de  $380,6 \pm 30,53$  (332-415) nanòmetres per a diabètics secundaris ERM i  $319 \pm 7.26$  (312-331) nanòmetres per a MER idiopàtiques. L'anàlisi estadística de l'edema macular es va realitzar mitjançant una prova t de dues cares, les diferències entre ambdós grups de pacients van ser significatives ( $p=0,002$ ).

## b) Microscòpia òptica

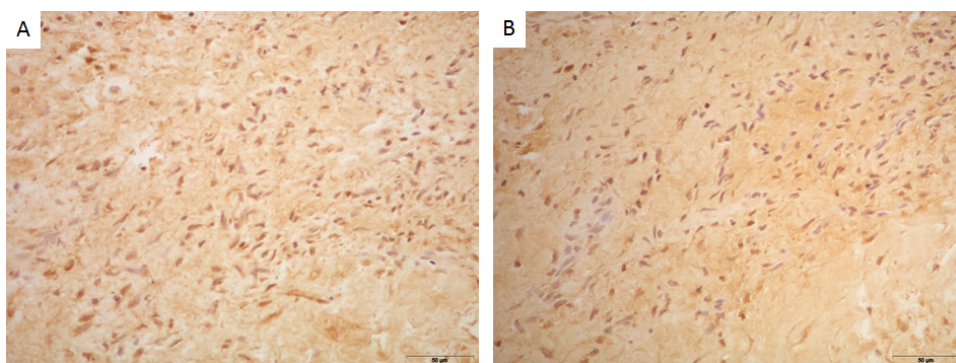
L'examen de microscòpia òptica va demostrar la presència de material fibro-hialí en tots els casos (**Taula 12**), probablement format per diferents tipus de col·lagen. Les cèl·lules inflammatòries predominaven en pacients amb MER secundàries diabètiques (els macròfags estan presents en els casos 1, 3 i 4.) En tots els casos amb MER idiopàtiques, trobem cèl·lules epitelials-cuboidals, però no signes d'inflamació.

Patient	Histologia	Paraxonasa-PON1	4-HNE
1	Material firbohiali, Macrofags	Sí	Si
2	Material firbohiali, Astrocytes and inflammatory changes	Sí	Sí
3	Material firbohiali, Macrofags	Sí	Sí
4	Material firbohiali, Macrofags	Sí	Sí
5	Material firbohiali, no cèl·lules	Sí	Sí
6	Material firbohiali, cèl·lules cuboidals	Sí	No
7	Material firbohiali, cèl·lules cuboidals	Sí	No
8	Material firbohiali, cèl·lules cuboidals	Sí	No
9	Material firbohiali, cèl·lules cuboidals	Sí	No
10	Material firbohiali, no cèl·lules	Sí	No

**Taula 12.** Resultats de l'estudi de microscòpia òptica e histoquímica

## c) Anàlisi PON1 en MER

La **Figura 55** mostra que PON1 s'ha observat en tots els casos. Es va observar 4-hidroxiacetal (4-HNE) en totes les MER de diabetis secundària, però no en casos amb MER idiopàtiques.



**Figura 55.** Representative examples of the analyses of PON1 (A) and 4-HNE protein adducts (B) in human diabetic macular edema epiretinal membrane (magnification  $\times 200$ ).





---

Prèviament als resultats de l'estudi actual, el grup de recerca biomèdica de l'Institut d'Investigació Sanitàries Pere Virgili (IISPV), havia publicat estudis sobre la PON en altres malalties, en concret en les hepatopaties cròniques, on es va observar que la disminució significativa de l'activitat de PON1 en malalties hepàtiques cròniques està relacionada amb el grau de disfunció hepàtica i no amb diferències al·lèliques o genotípiques<sup>18</sup>.

A més, el nostre grup de recerca en oftalmologia del IISPV, va estudiar les relacions entre la PON1 i les alteracions de l'endoteli corneal en els pacients amb malaltia pulmonar crònica (MPOC), on es va demostrar una disminució significativa de l'activitat de PON1 en sèrum i una disminució significativa en la densitat de cèl·lules endotelials corneals<sup>9</sup>. Així mateix Fang et al.<sup>19</sup> mitjançant estudis genètics, van analitzar els polimorfismes que afecten l'activitat de la PON1 i van observar que aquells fenotips que mostraven una activitat alta presentaven un menor risc de desenvolupar càncer<sup>19</sup>.

En el present estudi es va demostrar un augment de PON1 i PON3 a nivell de sèrum/plasma en diabètics, amb resultats estadísticament significatius, creiem que com a mecanisme compensatori a un estat metabòlic alterat, sobretot en primeres fases de la malaltia. Dades que no són iguals en altres estudis del grup Karabina et al.<sup>10</sup> en que havien obtingut resultats que suggerien que la protecció de l'activitat esterolítica de PON1 per antioxidants era important per preservar la seva acció sobre els peròxids de fosfolípids, dit d'una altra manera, que un increment de l'estrès oxidatiu en diabètics comportava a una pèrdua en l'activitat PON1, a més, la disminució en l'activitat de PON1 estava inversament relacionada amb els nivells de LDL oxidades en el sèrum/plasma d'aquests pacients. Creiem que els dos arguments poden ser possibles però que la variació dels valors de la PON pot estar relacionada segons la fase de la malaltia en la que es troba el pacient

Les troballes més significatives van ser, d'una banda, una correlació positiva amb significació estadística entre els graus d'activitat paraoxonasa i lactonasa en humor vitri i el valor de HbA1c dels ulls diabètics. Creiem que va ser una troballa important tenint en compte que l'HbA1c és un dels marcadors de l'estat diabètic del malalt a mig i llarg termini, es va visualitzar

clarament seguint les línies de tendència de les gràfiques de correlació. I, d'altra banda, l'augment de producció de PON1 i PON3 a nivell d'humor vitri en els casos d'edema macular diabètic els casos. El grup que no mostrava EMD també englobava pacients diabètics, resultat que ens fa pensar que aquest augment estadísticament significatiu de PON1 i PON3 en humor vitri, es troba més greument afectat en els casos que associen complicacions inflamatòries. La publicació de Karabina et al.<sup>352</sup> tracta de conèixer la distribució tissular de quimiocines, PON i mediadors de la inflamació en les situacions que engloben accions antioxidants i antiinflamatòries, utilitzant immunohistoquímica i PCR quantitativa en temps real es va investigar PON1 i missatger en 23 teixits de ratolins, obtenint una presència de PON1, PON2 i PON3, i quimiocines en la majoria dels teixits investigats i, sorprenentment l'àcid ribonucleic missatger (ARNm) d'aquestes proteïnes també es va expressar en la major part d'aquests teixits suggerint una producció local i la capacitat de respondre in situ als estímuls inflamatoris. A més, l'àmplia distribució i expressió de l'ARNm per PON i citoquines suggerien un paper sistèmic, probablement coordinat, en la resposta inflamatòria global.

L'augment de PON1 i PON3 en humor vitri en els ulls de pacients diabètics amb edema macular respecte als ulls de pacients diabètics sense edema macular i respecte als ulls de pacients no diabètics, suggeriria un augment de la presència d'aquests enzims com a possible mecanisme compensatori davant l'estat inflamatòri de la retina.

Sobre les diferències d'avaluació de la PON entre diabètics amb RD i sense RD parla l'estudi de Nowak et al.<sup>404</sup> els resultats es basen en comparar pacients diabètics sense RD i pacients diabètics amb RD, obtenint valors significativament elevats de high-sensitivity C-reactivi protein (hs-CRP) i inferiors de PON1 en sèrum/plasma en els pacients diabètics amb RD, que confirmaria que l'estrès oxidatiu podria tenir un paper en la patogènesi de la RD. A causa de la diferència significativa en la relació PON1/PCR entre els pacients diabètics amb i sense RD, sembla que aquesta relació PON1/PCR pot utilitzar-se com un marcador bioquímic per a la progressió de la RD, encara que, evidentment, es necessitaria més estudis al respecte.

Altres estudis<sup>341</sup> parlen sobre la influència de PON1 sobre les alteracions metabòliques induïdes per les LDL oxidades. Els resultats suggereixen que PON1 pot tenir un paper significatiu en la supervivència de cèl·lules endotelials mitjançant la protecció de les mateixes de les alteracions de la cadena induïda per les LDL oxidades, ja que hi ha un paper protector de HDL i PON1 contra l'oxidació i l'apoptosi en les cèl·lules endotelials. Així doncs les HDL de ratolins deficientes de PON1

tenien una capacitat deteriorada per protegir les cèl·lules endotelials de les LDL oxidades. En aquest sentit s'han també s'han realitzat estudis<sup>342</sup> on s'avaluava els efectes de la metformina en el fetge de ratolins deficients de PON1 que, sense tractar, presentaven un grau lleu d'esteatosi hepàtica. L'administració de metformina va agreujar la inflamació en els animals que van rebre un aliment estàndard per a ratolins en comparació amb aquells alimentats amb una dieta rica en greixos, així doncs, podem deduir que l'administració de metformina produeix efectes indesitjables en el fetge dels ratolins deficients de PON1. El nostre estudi no va obtenir resultats rellevants en aquest sentit ja que es va trobar un augment d'activitat paraoxonasa en sèrum/plasma i valors de PON1 en humor vitri disminuïts en els ulls de pacients dislipèmics, comparats amb els no dislipèmics.

Respecte de l'estudi de les MER extretes, hem de tenir en compte que són causes importants de discapacitat visual en la gent gran, la seva prevalença és del 7% en persones majors de 49 anys d'acord amb el Blue Eye Study<sup>405</sup>. La prevalença és lleugerament superior en les dones (7,7%) que en els homes (6%) i augmenta amb l'edat del 7,2% a les persones dels 60, fins al 9,3% a les persones majors de 80 anys<sup>406</sup>. A més, aquest ampli estudi va demostrar que la diabetis mellitus és l'únic factor de risc important, amb una proporció Odds de 3.21 IC95% 1.43-7.23, amb una significació de  $p < 0.001$ . Les membranes externes es poden presentar com idiopàtiques o secundàries a patologies com el despreniment de retina, retinopatia diabètica o altres vasculopaties.

Histològicament, les membranes idiopàtiques presenten una cèl·lula monocapa formada per cèl·lules gials o epitelials (l'origen d'aquestes cèl·lules està obert a la discussió). Les MER secundàries estan formades per un multicapa amb altres cèl·lules, com a cèl·lules inflamatòries. Les MER comencen amb característiques similars al celofan, llavors apareix una membrana engruixida més fibrosa, especialment en membranes secundàries. Hem basat el nostre estudi sobre la lletra, més espessa, perquè implica una simptomatologia visual patològica, com la metamorfosi i la disminució de l'agudesa visual. Les MER es tracten mitjançant vitrectomia i escissió, especialment quan l'agudesa visual disminueix fins a 0,4 i/o la metamorfopsia està present.

A partir de l'etiologia, es van extingir cinc casos de MER secundàries diabètiques i cinc casos de MER idiopàtiques. En tots els casos, es va realitzar un estudi microscòpic, que va demostrar la presència de macròfags en tres dels quatre pacients amb MER secundàries

diabètiques i astròcits fibrosos en un altre. En casos de MER idiopàtiques, es van trobar cèl·lules epitelials pigmentades cuboidals en quatre dels cinc casos.

En el present estudi, es va trobar l'enzim PON1 en les membranes epiretina en tots els casos, que és un enzim associat a lipoproteïnes HDL. Protegeix les lipoproteïnes de l'oxidació<sup>407</sup>, que és la base de la malaltia microvascular en la diabetis, demostrada per la toxicitat de les lipoproteïnes oxidades per a cèl·lules endotelials i perícits en els capil·lars de la retina<sup>408</sup>. L'activitat de PON1 també es redueix en el sèrum dels pacients amb diabetis, per la qual cosa és important determinar si està present en estructures intraoculars (vitri o retina). Cal tenir en compte que les estructures oculars tenen una doble barrera important, la barrera retino-vascular interna, formada per perícits, unions de cèl·lules endotelials i una membrana basal i la barrera retina vascular externa entre la retina i la coroide formada per una capa epitelial pigmentada, que impedeix el pas de macromolècules com lipoproteïnes al vitre o la retina. Encara no s'ha entès com pot aparèixer l'enzim de PON1 a les membranes de la retina. Pot ser secundari a una ruptura de la barrera de la retina o de la producció de la retina, que serà el focus del nostre proper estudi. Les MER estan formades per l'activitat de diferents cèl·lules (cèl·lules pigmentàries retinals, cèl·lules gials, macròfags, etc.), però també són atretes per l'estrès oxidatiu, de manera que no seria raonable suposar que l'enzim de PON1 tingui un paper important. La seva presència en l'estructura de les MER en la nostra mostra suposa que l'estrès oxidatiu podria jugar un paper en la formació de membranes. De fet, l'estrès oxidatiu induït per la peroxidació lipídica ha estat implicat en la patogènia de moltes malalties retinals, com la degeneració macular associada a l'edat i la RD<sup>409,410</sup>. La retina és susceptible a l'estrès oxidatiu a causa de la seva constant exposició a espècies ROS produïdes per llum ultraviolada visible. Les cèl·lules epitelials de pigments retinals recolzen els fotoreceptors i són rics en àcids grassos poliinsaturats.

Les limitacions de l'estudi van incloure, en primer lloc, el número d'ulls, sobretot en intentar comparar la subpoblació diabètica i la no diabètica, i encara més agreujat en intentar excloure els casos de hemovitrí en algunes comparacions estadístiques, que ja no van ser possibles pel nombre insuficient de casos, i el programa estadístic no ho permetia. L'altra limitació va ser que, es va acceptar prèviament amb el CEIC de l'Hospital el no intervenir quirúrgicament per a l'obtenció de mostra d'humor vitri als ulls que no hi hagués una indicació quirúrgica per fer-ho, d'aquesta manera no podem obtenir mostres suficients de diabètics que no precisen cirurgia.

Tenint en compte que no hi ha referències d'altres estudis similars i les limitacions de l'estudi, ens va costar extreure conclusions fermes sobre els resultats obtinguts. Però tot i això creiem que hi ha una via de camí en la cascada inflamatòria on la PON hi té molt a veure i que una modulació a aquest nivell podria ajudar a frenar els efectes secundaris de, en el nostre cas, la RD. Cal tenir en compte que els valors de PON i d'altres components de la cascada inflamatòria poden estar influenciats per variables interpersonals de cada pacient com ja em comentat en l'apartat de relació de la es MNT i la PON, com per exemple en els casos de malaltia hepàtica, on poden existir valors inferiors de PON ja que aquesta es sintetitza principalment en el fetge<sup>229</sup> amb una variabilitat interpersonal en l'edat, el fumar i la obesitat, entre d'altres.



## CONCLUSIONS

---



1. El nostre projecte va mostrar un augment de PON1 i PON3 a nivell de sèrum/plasma al comparar ulls de pacients diabètics i no diabètics, amb significació estadística, que suggereixen que davant un increment de l'estrès oxidatiu en diabètics existeix un augment de producció d'aquests enzims per poder fer front a l'alteració metabòlica. Tanmateix els valors de la mitja al comparar el subgrup de ulls de pacients amb retinopatia diabètica amb els ulls de pacients diabètics i ulls de pacients no diabètics, també mostra un augment d'aquest valor.
2. En els casos de ulls amb hemovitri vam trobar disminució de la mitja de PON1 en vitri, i PON3 augmentada, respecte als valors generals de la mostra. Tenint en compte que tots els casos de hemovitri del estudi eren diabètics podem deduir que PON 1 i PON 3 no actuarien de la mateixa manera.
3. Els valors de PON1 i PON 3 en humor vitri estaven augmentats en ulls de pacients diabètics amb edema macular, respecte als ulls de pacients diabètics sense edema macular i també respecte als ulls de pacients sense DM, amb resultats estadísticament significatius. Tenint en compte que l'edema macular associa les formes més greus de la RD, podem observar un augment de presència/producció de PON1 i PON3 en les formes més greus de la RD respecte les inicials com a possible mecanisme compensatori.
4. La ratio de PON 1 i PON3 en vitri/sèrum estava augmentada en els casos de ulls de pacients diabètics amb edema macular, respecte als ulls de pacients diabètics sense edema macular, amb resultats estadísticament significatius.
5. Es va demostrar una correlació positiva amb significació estadística entre els graus d'activitat paraoxonasa i lactonasa en humor vitri i el valor de HbA1c dels ulls de pacients diabètics. Creiem que es una troballa important tenint en compte que l'HbA1c és un dels marcadors de l'estat diabètic del malalt a mig/llarg termini, es va visualitzar clarament seguint les línies de tendència de les gràfiques de correlació.
6. Respecte a les membranes epiretinianes analitzades es va observar la presència de PON 1 tant en els malalts amb MER idiopàtica i en els malalts amb MER secundària

- a DM, però només en aquests últims vam detectar la presència de 4-hidroxi-2-nonenal i material inflamatori a la microscopia òptica, el que suggereix que hi ha activitat de estrès oxidatiu en els malalts amb MER secundària a diabetis.
7. Finalment, el vincle entre la concentració antioxidant, la inflamació i el desenvolupament de complicacions de la diabetis requereix estudis addicionals per tal de confirmar els nostres descobriments.

## BIBLIOGRAFIA

---



1. American Diabetes Association. *Diagnosis and classification of diabetes mellitus*. Diabetes Care 2007 Jan;30(Suppl 1):S42-S47.
2. Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus*. Diabetes Care 1997;20:1183-1197.
3. World Health Organization, Department of Noncommunicable Disease Surveillance. *Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Report of a WHO consultation. Part1: diagnosis and classification of diabetes mellitus*. Geneva, 1999.
4. World Health Organization. *Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia*. Geneva, 2006.
5. Organización Mundial de la Salud. *Informe mundial sobre la diabetes*. Acceso 30 de noviembre 2016.
6. Mathers CD, Loncar D. *Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030*. PLoS Med. 2006;3(11):e442.
7. Organización Mundial de la Salud. *Plan de acción mundial para la prevención y control de las enfermedades no transmisibles 2013-2020*. Acceso 30 de noviembre 2016.
8. Cavallerano JD. *A review of non-retinal ocular complications of diabetes mellitus*. J Am Optm Assoc 1991; 61 : 533-543.
9. Provis, J.M., Henrickson, A.E.. *The foveal avascular region of developing human retina*. Arch. Ophthalmol 2008;126:507–511.
10. Cunha-Vaz, J.G.. *The blood-ocular barriers*. Surv. Ophthalmol 1979,23.279–96.
11. Cunha-Vaz, J.G.: *The blood-retinal barriers system*. Basic concepts and clinical evaluation. Review. Exp. Eye Res. 2004, 78, 715–721.
12. Davson, H.: *The aqueous humour and the intraocular pressure (chapter 1)*. In: Davson, H. (ed.) *Physiology of the Eye*, 5th edn, pp. 3–95. MacMillan, London .

13. Goldmann, E.E.: *Vitalfärbung am Zentralnervensystem*. Abhandl Königl Preuss. Akad Wiss 1, 1–60 (1913).
14. Anderson DR. *Glaucoma, capillaries and pericytes*. Ophthalmologica. 1996; 210: 257–262.
15. Kontos HA, Wei EP, Raper AJ, Patterson JL Jr. *Local mechanism of CO2 action of cat pial arterioles*. Stroke. 1977; 8: 226–229.
16. Yamanishi S, Katsumura K, Kobayashi T, et al. *Extracellular lactate as a dynamic vasoactive signal in the rat retinal microvasculature*. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2006; 290: H925–934.
17. Muthusamy A, Lin CM, Shanmugam S, Lindner HM, et al. *Ischemia-reperfusion injury induces occludin phosphorylation/ubiquitination and retinal vascular permeability in a VEGFR-2-dependent manner*. J Cereb Blood Flow Metab. 2014;34(3):522-31.
18. Leal E.C., Manivannan A, Hosoya K, Terasaki T, et al. *Inducible nitric oxide synthase isoform is a key mediator of leukostasis and blood-retinal barrier breakdown in diabetic retinopathy*. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2007;48(11):5257-65.
19. Van Itallie CM, Anderson JM. *Claudin interactions in and out of the tight junction*. Tissue Barriers. 2013;1;1(3).
20. Kaur C., Rathnasamy G, Ling EA. *Roles of activated microglia in hypoxia induced neuroinflammation in the developing brain and the retina*. J Neuroimmune Pharmacol. 2013;8(1):66-78.
21. Kaji Y., Usui T., Ishida S, et al. *Inhibition of diabetic leukostasis and blood-retinal barrier breakdown with a soluble form of a receptor for advanced glycation end products*. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2007;48(2):858-65.
22. Mackness M, Mackness B. *Human paraoxonase-1 (PON1): Gene structure and expression, promiscuous activities and multiple physiological roles*. Gene. 2015 Aug 1;567(1):12-21. doi: 10.1016/j.gene.2015.04.088.
23. Ibáñez J., Cristóbal JA, Faure E, et al. *Use of retinal photography in the diagnosis of diabetic macular edema*. Arch Soc Esp Oftalmol. 2013 Jul;88(7):250-4.
24. Brown JC, Solomon SD, Bressler SB, et al. *Detection of diabetic foveal edema: contact lens biomicroscopy compared with optical coherence tomography*. Arch

Ophthalmol. 2004;122:330–335.

25. Beck RW, Moke PS, Turpin AH, et al. *A computerized method of visual acuity testing: adaptation of the early treatment of diabetic retinopathy study testing protocol.* Am J Ophthalmol. 2003;135:194–205.
26. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group. *Photocoagulation for diabetic macular edema: Early Treatment Diabetic Retinopathy Study report no. 4.* Int Ophthalmol Clin. 1987;27:265–272.
27. Browning DJ, McOwen MD, Bowen RM, et al.. *Comparison of the clinical diagnosis of diabetic macular edema with diagnosis by optical coherence tomography.* Ophthalmology. 2004;111:712–715.
28. Browning DJ, Fraser CM. *The predictive value of patient and eye characteristics on the course of subclinical diabetic macular edema.* Am J Ophthalmol. 2008;145:149–154.
29. Richer S. *Exam room, chair side evaluation of retinal edema: improving accuracy and precision for identification of subclinical diabetic macular edema.* Optometry. 2007;78(12):664-73.
30. Pérez-de-Arcelus M, Andonegui J, Serrano L, et al. *Diabetic retinopathy screening by general practitioners using non-mydratic retinography.* Curr Diabetes Rev. 2013 Jan 1;9(1):2-6.
31. Duker JS, Brown GC, Bosley TM, et al. *Asymmetric proliferative diabetic retinopathy and carotid artery disease.* Ophthalmology. 1990;97(7):869–74.
32. Hellstedt T, Vesti E, Immonen I. *Identification of individual microaneurysms: a comparison between fluorescein angiograms and red-free and colour photographs.* Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 1996;234(Suppl 1):S13–17.
33. Friberg TR, Lace J, Rosenstock J, et al. *Retinal microaneurysm counts in diabetic retinopathy: colour photography versus fluorescein angiography.* Can J Ophthalmol. 1987;22(4):226–229.
34. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group. *Fluorescein angiographic risk factors for progression of diabetic retinopathy. EDTRS report number 13.* Ophthalmology. 1991;98:834–40.
35. David J. Browning, Michael M. Altaweel, Neil M. Bressler, et al. *Scott for the Diabetic Retinopathy Clinical Research Network. Diabetic Macular Edema: What is Focal*

*and What is Diffuse?* Am J Ophthalmol. 2008; 146(5): 649–655.

36. Byeon SH, Kim M, Kwon OW. et al Ischemia. *Optical coherence tomography. A clinical and technical update*. Berlin: Springer; 2012. pp. 24–26.
37. Querques G, Lattanzio R, Querques L, et al *Enhanced depth imaging optical coherence tomography in type 2 diabetes*. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2012;53(10):6017–6024.
38. Vujosevic S, Martini F, Cavarzeran F, et al. *Macular and peripapillary choroidal thickness in diabetic patients*. Retina. 2012;32(9):1781–1790.
39. Bresnick GH, Condit R, Syrjala S, et al *Abnormalities of the foveal avascular zone in diabetic retinopathy*. Arch Ophthalmol. 1984;102(9):1286–1293.
40. Arend O, Wolf S, Jung F, et al. *Retinal microcirculation in patients with diabetes mellitus: dynamic and morphological analysis of perifoveal capillary network*. Br J Ophthalmol. 1991;75(9):514–518.
41. Mansour AM, Schachat A, Bodiford G, et al. *Foveal avascular zone in diabetes mellitus*. Retina. 1993;13(2):125–128.
42. Conrath J, Giorgi R, Raccah D, et al.. *Foveal avascular zone in diabetic retinopathy: quantitative vs qualitative assessment*. Eye (Lond) 2005;19(3):322–326.
43. Massin P, Vicaut E, Haouchine B, et al. *Reproducibility of retinal mapping using optical coherence tomography*. Arch Ophthalmol. 2001;119:1135–42.
44. Tangelder G, Van der Heijde R, Polak B, et al. *Precision and reliability of retinal thickness measurements in foveal and extrafoveal areas of healthy and diabetic eyes*. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2008;49:2627–34.
45. Paunescu L, Schuman J, Price L, et al. *Reproducibility of nerve fiber thickness, macular thickness, and optic nerve head measurements using Stratus OCT*. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2004;45:1716–24.
46. Panozzo G, Parolini B, Gusson E, et al. *Diabetic macular edema: an OCT-based classification*. Semin Ophthalmol. 2004;19(1-2):13-20.
47. Ophir A, Martinez MR. *Epiretinal membranes and incomplete posterior vitreous detachment in diabetic macular edema, detected by spectral-domain optical coherence tomography*. Investigative Ophthalmology & Visual Science. 2011;52:6414–642.
48. Gandorfer A, Rohleder M, Grosselfinger S, et al. *Epiretinal pathology of diffuse*

- diabetic macular edema associated with vitreomacular traction*. American Journal of Ophthalmology. 2005;139(4):638–652.
49. Koizumi H, Spaide RF, Fisher YL, et al. *Three- Dimensional Evaluation of Vitreomacular Traction and Epiretinal Membrane Using Spectral-Domain Optical Coherence Tomography*. American Journal of Ophthalmology. 2008;145(3):509–11.
50. Sakamoto A, Nishijima K, Kita M, et al. *Association between foveal photoreceptor status and visual acuity after resolution of diabetic macular edema by pars plana vitrectomy*. Graefes Arch Clin Ex Ophthalmol. 2009;247:1325–30.
51. Anjali S. Maheshwary, Stephen F. Oster, Ritchie M.S. Yuson et al. *The Association between Percent Disruption of the Photoreceptor Inner Segment/Outer Segment and Visual Acuity in Diabetic Macular Edema*. Am J Ophthalmol. Jul 2010; 150(1): 63–67.
52. Hood DC. *Assessing retinal function with the multifocal technique*. Prog Retin Eye Res. 2000;19(5):607–646.
53. Marmor MF, Holder GE, Seeliger MW, et al. *International Society for Clinical Electrophysiology of Vision. Standard for clinical electroretinography*. Doc Ophthalmol 108:107–114.
54. Sutter EE, Tran D. *The full field topography of ERG components in man. The photopic luminance response*. Vision Res. 1992;32(3):433–446.
55. 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*. N Engl J Med 1993; 329:977-986.
56. 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*. Lancet 1998; 352:837-853.
57. Ciulla TA, Amador AG, Zinman B. et al. *Diabetic Retinopathy and Diabetic Macular Edema*. Pathophysiology, screening, and novel therapies. Diabetes Care 20.
58. Elizalde J. *Evaluación cuantitativa de la barrera hematoacuosa ocular como índice de actividad de la retinopatía diabética proliferativa*. Tesis doctoral. Insitut Universitari Barraquer, Barcelona, 2003; 26:2653-2664.
59. Brownlee M. *The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism*. Diabetes 2005; 54 (6): 1615-25.

60. Gabbay KH. *Hyperglycemia, polyol metabolism, and complications of diabetes mellitus*. Annu Rev Med 1975; 26:521-536
61. Sheetz MJ, King GL.: *Molecular understanding of hyperglycemia's adverse effects for diabetic complications*. JAMA 2002;288:2579-2588.
62. Riva CE, Grunwald JE, Petrig BL. *Autoregulation of human retinal blood flow. An investigation with laser Doppler velocimetry*. Invest Ophthalmol Vis Sci 1986; 27: 1706-1712.
63. Langian LP, Clark CV, Allawi J, et al. *Responses of the retinal circulation to systemic autonomic stimulation in diabetes mellitus*. Eye 1989;3: 39-47.
64. Koerner F, Imobersteg A, Nager G. *Measurement of vascular diameters in diabetic retinopathy before and after photocoagulation*. Klin Monasbi Augenheilkd 1990; 196:354-356.
65. Tagawa H, Fekete GT, McMeel JW. *Retinal circulatory changes in diabetic retinopathy*. Acta Soc Ophthalmol Jpn 1988; 92: 699-704.
66. Sharma NN, Gardiner TA, Archer DB. *A morphologic and autoradiographic study of cell death and regeneration in the retinal microvasculature of normal and diabetic rats*. Am J Ophthalmol 1985; 100(1): 51-60.
67. Van Haeringen NJ, Oosterhuis JA, Terpstra J, et al. *Erythrocyte aggregation in relation to diabetic retinopathy*. Diabetologia 1973; 9: 20-24.
68. Diamantopoulos EJ, Raptis SA, Mouloupoulos SD. *Red blood deformability index in diabetic retinopathy*. Horm Metab Res 1987; 19: 569-573.
69. Dobbie JG, Kwaan HC, Colwell J et al. *Role of platelets in pathogenesis of diabetic retinopathy*. Arch Ophthalmol 1974; 91: 107-109.
70. Sivalingam A, Kennedy J, Brown et al. *Basic fibroblast growth factor levels in the vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy*. Arch Ophthalmol 1990; 108: 896-872.
71. Ozaki H, Okamoto N, Ortega S, et al. *Basic fibroblast growth factor is neither necessary nor sufficient for the development of retina neovascularization*. AMM J Pathol 1998; 92: 365-371.
72. Azahara T, Bauters C, Zheng LP, et al. *Synergistic effect of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth on angiogenesis in vivo*. Circulation 1995; 92: 365-371.

73. Smith LE, Kopchick JJ, Chen W, et al. *Essential role of growth hormone in ischemia-induced retinal neovascularization*. Science 1997; 276: 1706-1709.
74. Flynn HW Jr, Smiddy WE. *Diabetes and ocular disease: past, present and future therapies*. Ophthalmology Monograph 14 from The Foundation of the American academy of Ophthalmology, san Francisco, 2000.
75. Sharp Ps, Fallon TJ, Brazier Oj et al. *Long term follow-up of patients who underwent yttrium-90 pituitary implantation for treatment of proliferative diabetic retinopathy*. Diabetologia 1987; 30: 199-207.
76. Katsura Y, Odano T, Noritake M, et al. *Hepatocyte growth factor in vitreous fluid of patients with proliferative diabetic retinopathy and other retinal disorders*. Diabetes Care 1998; 21: 1759-1763.
77. Amin RH, Frank RN, Kennedy A, et al. *Vascular endothelial growth factor is present in glial cells of the retina and optic nerve of human subjects with nonproliferative diabetic retinopathy*. Invest Ophthalmol Vis Sci 1997; 38: 36-47.
78. Rohrbach DH, Wagner CW, Star VL et al. *Reduce synthesis of basement membrane heparan sulfate proteoglycan in streptozocin-induced diabetic mice*. J Biol Chem 1983; 258; 11672-11677.
79. Javitt JC, Aiello LP, Chiang Y, et al. *Preventive eye care in people with diabetes is cost-saving to the federal government. Implications for health-care reform*. Diabetes Care 1994; 17: 909-917.
80. Klein R, Klein BEK, Moss SE et al. *The Wisconsin Epidemiologic Study of diabetic retinopathy II: prevalence and risk of retinopathy when age at diagnosis is less than 30 years*. Arch Ophthalmol 1984; 102:520-526.
81. Bresnick GH. *Diabetic retinopathy viewed as a neurosensorial disorder*. Arch Ophthalmol 1986; 104: 989-990.
82. Diabetic Retinopathy Study Research Group. *A modification of the Airlie House Classification of diabetic retinopathy*. ETDRS report number 9. Ophthalmology 1991; 96 98:766-85.
83. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group. *A modification of the Airlie House Classification of diabetic retinopathy. Report Number 7*. Invest Ophthalmol Vis Sci 1981; 21: 210-16.

84. Klein R, Klein BE, Moss SE et al. *Glycosilated hemoglobin predicts the incidence and progression of diabetic retinopathy* JAMA 1988; 260: 2864-71.
85. Friedman EA. *Advanced glycosilated end products and hyperglycemia in the pathogenesis of diabetic complications*. Diabetes Care 1999; 22 (supl2); B65-71 .
86. Klein BEK, Moss SE, Klein R et al. *The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy XIII. Relationship of serum cholesterol to retinopathy and hard exudates*. Ophthalmology 1991; 98: 1261-1265.
87. Chew EY, Klein ML, Ferris FL, et al. *Association of elevated serum lipid levels with retinal hard exudates in diabetic retinopathy ETDRS. Report 22*. Arch Ophtalmol 1966; 114:1079-1084.
88. Gupta A, Gupta V, Thapar S, et al. *Lipid-lowering atrovastatin as an adjunct in the management of diabetic macular edema*. Am J Ophtalmol 2004; 137 (4): 675-682.
89. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Group. *Fundus fotografic risk factors for progression of diabetic retinopathy. ETDRS report number 12*. Ophthalmology 1991; 98:807-22.
90. Muraoka K, Shimizu K., Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Group. *Intraretinal neovascularization in diabetic retinopathy. ETDRS report number 12*. Ophthalmology 1991; 98:807-22.
91. Araiz J. *Presentación clínica de la retinopatía diabética no proliferante*. Tratado Médico Quirúrgico. Ed Mac Line, SL. 2006, 114-126.
92. Michaelson IC. *The moe of development of the vascular system of the retina, with sme observations on its significance for certain retina disease*. Trans Ophtalmol Soc UK 1948; 68:137-180.
93. Asthon N. *Retinal vascularization in health and disease*. AM J Ophtalmol 1957; 44: 7-24.
94. Klein R. *The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinoathy IV. Diabetic macular edema*. Ophthalmology 1984; 91: 1464-1474.
95. Tagawa H, Mc Meel JW, Trempe CL. *Role of the vitreous in diabetic retinopathy: II. Active and inactive vitreous changes*. Ophthalmology 1986; 93:1188-1192.
96. Bonafonte S, Garcia CA. *Retinopatía diabética*. 2ª Edición. Editorial Elsevier, Madrid, 2006.

97. CP Wilkinson, Ferris FL 3rd, Klein RE. *Proposed internacional clinic diabetic retinopathy and diabetic macularoedema disease severity scales*. Ophthalmology 2003; 110: 1677-1682.
98. Lafuente M. *Retinopatía Diabética*. Servicio de Oftalmología Hospital General Universitario de Murcia. Ed. Alcandora Publicidad S. L. 2005.
99. Conrath J, Giorgi R, Ridings B., et al. *Metabolic factors and the foveal avascular zone of the retina in diabetes mellitus*. Diabetes Metabolism 2005; 31:465-470.
100. Gil Hernández MA, Abreu Reyes P. *Medida de la zona avascular foveal (ZAF) en pacientes diabéticos*. Archivos de Sociedad Canaria de Oftalmologia 2001; 12:11-14.
101. Parving HH, Vibenti GC, Kern H et al. *Hemodynamic factors in the genesis of diabetic microangiopathy*. Metabolism 1983; 32:993-999.
102. Enden MK, Nyengaard, JR, Ostrow, E et al. *Elevated glucose levels increase retinal glycolysis and sorbitol pathway metabolism*. Invest Ophthalmol Vis Sci 1994; 33:2968-2975.
103. Aiello LI, Avery R, Arrigg P, et al. *Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders*. N Engl J Med 1994, 331:1480-1487.
104. Itakura H, Kishi S, Kotajima N, et al. *Persistent secretion of Vascular Endothelial Growth Factor into the Vitreous Cavity in Proliferative Diabetic Retinopathy after Vitrectomy*. Ophthalmology 2004; 111:1880-1884 .
105. American Diabetes Assciation. *Diabetes Care, volume 31, supplement 1*. January 2008.
106. Olafsdóttir E, Stefánsson E. *Biennial eye screening in patients with diabetes without retinopathy: 10-year experience*. Br J Ophthalmol. 2007; 91: 1599-601.
107. Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *Progression of retinopathy with intensive versus conventional treatment in the diabetes Control and Complications Trial*. Ophthalmology. 1995; 102: 647-661.
108. Diabetes Control and Complications Trial Epidemiology of diabetes Interventions and Complications Research Group. *Retinopathy and Nephropathy in patients with tipo 1 diabetes four year after a trial of intensive therapy*. N England J Med. 2003, 42: 381-389.

109. Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *The relationship of glycemic exposure (HbA1c) to the risk of development and progression of retinopathy in the diabetes Control and Complications Trial*. Diabetes 1995, 44: 968-983.
110. Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *The effect of intensive treatment of diabetes on development and progression of long termof long term complications in insulin-dependent diabetes mellitud*. N England J Med. 1993. 329: 977-986.
111. 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)*. Lancet. 1998; 352: 837- 853.
112. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Tight blood pressure control and risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes: UKPDS 38*. BMJ. 1998; 317: 703-713.
113. Sothornwit N. *Intravitreal bevacizumab for ahmed glaucoma valve implantation in neovascular glaucoma: a case report*. J Med Assoc Thai. 2008; 91 Suppl 1: S162-165.
114. Mason JO 3rd, Yunker JJ, Vail R, McGwin G Jr. *Intravitreal bevacizumab (avastin) prevention of panretinal photocoagulation- induced complications in patients with severe proliferative diabetic retinopathy*. Retina. 2008 Jul 29.
115. National Eye Institute (NEI). *Laser-Ranibizumab-Triamcinolone for Proliferative Diabetic Retinopathy (LRTforDME+PRP)*. ClinicalTrials. gov Identifier: NCT00445003, July 2008.
116. Kaderli B, Avci R, Gelisken O, Yucel AA. *Intravitreal triamcinolone as an adjunct in the treatment of concomitant proliferative diabetic retinopathy and diffuse diabetic macular edema: combined IVTA and laser treatment for PDR with CSMO*. Int Ophthalmol. 2005; 26: 207-214.
117. Lida T. *Combined triamcinolone acetamide injection and grid laser photocoagulation: a promising treatment for diffuse diabetic macular edema?* Br J. Ophthalmol. 2007; 91: 407-408.
118. Shimura M, Nakazawa T, Yasuda K, et al. *Pretreatmentof posterior subtenon of triamcinolone acetamide has beneficial effects for gird pattern photocoagulation against diffuse diabetic macular oedema*. Br J Ophthalmol 2007; 91: 449-454.

119. Kang SW, Sa HS, Cho HY, et al. *Macular gird photocoagulation after intravitreal triamcinolone acetonide for diffuse diabetic macular edema*. Arch Ophthalmol 2006; 124: 653-658.
120. Haritoglou C, Neubauer A, Wolf A et al. *Intravitreal bevacizumab (Avastin) therapy for persistent diffuse diabetic macular edema*. Retina 2006; 26: 999-1005 .
121. Cabrera López F, Cabrera Marrero B, Baeta Bayón L, et al. *Actualización en el diagnóstico y tratamiento del edema macular diabético*. Archivos de la Sociedad Canaria de Oftalmología 2005; 16: 69-82.
122. Lewis H, Abrams GW, Blumenkranz MS, et al. *Vitreectomy for diabetic macular traction and edema associated with posterior hyaloid traction*. Ophthalmology 1992; 99: 753-759.
123. Harbour JW, Smiddy WE, Flynn HW, et al. *Vitreectomy for diabetic macular edema associated with thickened and taut posterior hyaloid membrane*. Am J Ophthalmol. 1996; 121: 405-413.
124. Gandorfer A, Messmer EM, Ulbig MW, et al. *Resolution of diabetic macular edema after surgical removal of the posterior hyaloid and the inner limiting membrane*. Retina 2000; 20: 126-133.
125. Avic R, Karderli B, Avic B, et al. *Pars plana vitrectomy and removal of the internal limiting membrane in the treatment of chronic macular edema*. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2004; 242: 845-852.
126. Recchia FM, Ruby AJ, Recchia CA. *Pars plana vitrectomy with removal of the internal limiting membrane in the treatment of persistent diabetic macular edema*. Am J Ophthalmol. 2005; 139: 447-454.
127. Matsumoto H, Yamanaka I, Hisatomi T, et al. *Triamcinolone assisted pars plana vitrectomy improves residual posterior vitreous hyaloid removal: ultrastructural analysis of the inner limiting membrane*. Retina 2007; 27: 174-179.
128. Bahadir M, Ertan A, Mertoglu O. *Visual acuity comparison of vitrectomy with and without internal limiting membrane removal in the treatment of diabetic macular edema*. Int Ophthalmol 2005; 26: 3-8.
129. Patel JI, Hykin PG, Schadt M et al. *Pars plana vitrectomy with and without peeling of the inner limiting membrane for diabetic macular edema*. Retina 2006; 26: 5-13.

130. Aboutable T. *Is removal of internal limiting membrane always necessary during surgery for refractory diffuse diabetic macular edema without evident epimacular proliferation?* Klin Mmonatsbl Augenheilkd 2006; 223: 681-686.
131. Meyer CH. *Current treatment approaches in diabetic macular edema.* Ophthalmologica. 2007; 221: 118-13.
132. David J. Browning, Christina M. Fraser and Michele E. Powers. *Comparison of the Magnitude and Time Course of Macular Thinning Induced by Different Interventions for Diabetic Macular Edema: Implications for Sequence of Application.* Ophthalmology, 113, 2006: 1713-1719.
133. Yanyali A, Nohutcu AF, Horozoglu F, et al. *Modified grid laser photocoagulation versus pars plana vitrectomy with internal limiting membrane removal in diabetic macular edema.* Am J Ophthalmol. 2005; 139: 795- 801.
134. Jonas JB. *Intravitreal triamcinolone acetonide: a change in paradigm.* Ophthalmic Res 2006; 38: 218-245.
135. Jonas, Degenring RF, Kreissig I, et al. *Intraocular pressure elevation after triamcinolone acetonide injection.* Ophthalmology 2006, 112: 593-8.
136. Kreissig I, Degenring RF and Jonas JB. *Diffuse macular edema. Intraocular pressure after intravitreal triamcinolone acetonide.* Ophthalmologie 2005; 102: 153-7.
137. Jonas, Kreissig I, Budde WM and Degenring RF. *Cataract surgery combined with intravitreal triamcinolone acetonide.* Eur J Ophthalmol 2005; 15: 329-325.
138. Chin HS, Park TS, Moon YS, Oh JH. *Difference in clearance of intravitreal triamcinolone acetonide between vitrectomized and nonvitrectomized eyes.* Retina. 2005; 25: 556-60.
139. Jonas JB. *Intravitreal Triamcinolone acetonide for treatment of intraocular oedematous and neovascular diseases.* Acta Ophthalmol Scand 2005, 83: 645-663.
140. Spandau UH, Derse M, Schmitz-Valckemberg P, et al. *Dosage dependency of intravitreal triamcinolone acetonide as treatment of diabetic macular oedema.* Br J Ophthalmol 2005, 89: 999-1003.
141. Gibran SK, Cullinae A, Jungkim S and Cleary PE. *Intravitreal Triamcinolone for diffuse diabetic macular edema.* Eye. 2000 Jun; 20: 720-72.

142. Jonas JB, Degenring RF, Kamppeeter BA, et al. *Duration of the effect of intravitreal triamcinolone acetonide as treatment for diffuse diabetic macular edema*. Am J Ophthalmol 2004; 138: 158-160.
143. Tachi N, Ogino N. *Vitrectomy for diffuse diabetic macular edema in cases of diabetic retinopathy*. Am J Ophthalmol. 1996; 122: 258-260.
144. Otani T, Kishi S. *A cotrolled study of vitrectomy for diabetic macular edema*. Am J Ophthalmol. 2002; 134: 214-219.
145. Figueroa MS, Contreras I, Noval S. *Surgical and anatomical outcomes of pars plana vitrectomy for diffuse nontractional diabetic macular edema*. Retina. 2008 Mar; 28: 420-6.
146. Kristen LH, William E, Harry W et al. *Pars plana vitrectomy with internal limiting membrana peeling for diabetic macular edema*. Retina 2008; 28: 410-419.
147. Avitabile T, Longo A, Reibaldi A. *Intravitreal triamcinolone compared with macular laser grid photocoagulation for the treatment of cystoid macular edema*. Am J Ophthalmol. 2005; 140: 695-698.
148. Diabetic Retinopathy Clinical Research Network. *A randomized trial comparing intravitreal triamcinolone acetonide and focal/grid photocoagulation for diabetic macular edema*. Ophthalmology. 2008; 115: 1447-1449.
149. Ho TC, Lai WW, Lam DS. *Intravitreal triamcinolone compared with macular laser grid photocoagulation for the treatment of cystoid macular edema*. Am J Ophthalmol. 2006 Apr; 141: 786-7.
150. Chung EJ, Roh MI, Kwon OW, Koh HJ. *Effects of macular ischemia on the outcome of intravitreal Bevacizumab therapy for diabetic macular edema*. Retina 2008; 28: 957-963.
151. Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway CA, et al. *Phylogenetic perspectives in innate immunity*. Science. 1999;284(5418):1313-8.
152. de Ferranti S, Mozaffarian D. *The perfect storm: obesity, adipocyte dysfunction, and metabolic consequences*. Clinical chemistry. 2008;54(6):945-55.
153. Rull A, Camps J, Alonso-Villaverde C, Joven J. *Insulin resistance, inflammation, and obesity: role of monocyte chemoattractant protein-1 (or CCL2) in the regulation of metabolism*. Mediators of inflammation. 2010.
154. Tarantino G, Savastano S, Colao A. *Hepatic steatosis, low-grade chronic inflammation and hormone/growth factor/adipokine imbalance*. World journal of gastroenterology.

2010;16(38):4773-83.

155. Vinaixa M, Rodriguez MA, Rull A, Beltran R, et al. *Metabolomic assessment of the effect of dietary cholesterol in the progressive development of fatty liver disease*. Journal of proteome research. 2010;9(5):2527- 38.
156. Westermann B. *Bioenergetic role of mitochondrial fusion and fission*. Biochimica et biophysica acta. 2012;1817(10):1833-8.
157. Hybertson BM, Gao B, Bose SK, McCord JM. *Oxidative stress in health and disease: the therapeutic potential of Nrf2 activation*. Molecular aspects of medicine. 2011;32(4-6):234-46.
158. Davies KJ. *Oxidative stress: the paradox of aerobic life*. Biochemical Society symposium. 1995;61:1-31 .
159. Conti V, Corbi G, Simeon V, et al. *Aging- related changes in oxidative stress response of human endothelial cells*. Aging clinical and experimental research. 2015;27(4):547-53.
160. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. *Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1993;90(17):7915-22.
161. Weseler AR, Bast A. *Oxidative stress and vascular function: implications for pharmacologic treatments*. Current hypertension reports. 2010;12(3):154-61.
162. Poli G, Leonarduzzi G, Biasi F, Chiarpotto E. *Oxidative stress and cell signalling*. Current medicinal chemistry. 2004;11(9):1163-82.
163. Shah AM, Sauer H. *Transmitting biological information using oxygen: reactive oxygen species as signalling molecules in cardiovascular pathophysiology*. Cardiovascular research. 2006;71(2):191-4.
164. Gulcin I. *Antioxidant activity of food constituents: an overview*. Archives of toxicology. 2012 Mar;86(3):345-9.
165. Gough DR, Cotter TG. *Hydrogen peroxide: a Jekyll and Hyde signalling molecule*. Cell death & disease. 2011;2:e213.
166. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, et al. I. *Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer*. Chemico-biological interactions. 2006;160(1):1-40.
167. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, et al. *Free radicals and antioxidants in normal*

- physiological functions and human disease*. The international journal of biochemistry & cell biology. 2007;39(1):44-84 .
168. Casimirri E, Stendardo M, Bonci M, et al. *Biomarkers of oxidative-stress and inflammation in exhaled breath condensate from hospital cleaners*. Biomarkers. 2015;9:1-8.
169. Chondrogianni N, Petropoulos I, Grimm S, et al. *Protein damage, repair and proteolysis*. Molecular aspects of medicine. 2014;35:1-71.
170. Sies H. *Strategies of antioxidant defense*. European journal of biochemistry / FEBS. 1993;215(2):213-9.
171. Bast A, Haenen G. *Nutritional Antioxidants: It Is Time to Categorise*. In: Lamprecht M, editor. Antioxidants in Sport Nutrition. Boca Raton (FL)2015.
172. Hernandez JA, Lopez-Sanchez RC, Rendon-Ramirez A. *Lipids and Oxidative Stress Associated with Ethanol-Induced Neurological Damage*. Oxidative medicine and cellular longevity. 2016;2016:1543809.
173. Arauz J, Ramos-Tovar E, Muriel P. *Redox state and methods to evaluate oxidative stress in liver damage: From bench to bedside*. Annals of hepatology. 2016;15(2):160-73.
174. Martinelli N, Consoli L, Girelli D, et al. *Paraoxonases: ancient substrate hunters and their evolving role in ischemic heart disease*. Advances in clinical chemistry. 2013;59:65-100.
175. Majno G & Joris I. *Cells, Tissues and Disease*. Oxford University Press; 2004.
176. Kumar V, Abbas AK & Aster JC. *Robbins Basic Pathology: Saunders*; 2012.
177. Pober JS, Sessa WC. *Evolving functions of endothelial cells in inflammation*. Nature reviews Immunology. 2007;7(10):803-15 .
178. Nathan C. *Neutrophils and immunity: challenges and opportunities*. Nature reviews Immunology. 2006;6(3):173-82.
179. Mayadas TN, Cullere X, Lowell CA. *The multifaceted functions of neutrophils*. Annual review of pathology. 2014;9:181-218.
180. Serhan CN, Savill J. *Resolution of inflammation: the beginning programs the end*. Nature immunology. 2005;6(12):1191-7.
181. Drayton DL, Liao S, Mounzer RH, Ruddle NH. *Lymphoid organ development: from ontogeny to neogenesis*. Nature immunology. 2006;7(4):344-53.

182. Primo-Parmo SL, Sorenson RC, Teiber J, et al. *The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family*. Genomics. 1996;33(3):498-507.
183. Sorenson RC, Primo-Parmo SL, Camper SA, et al. *The genetic mapping and gene structure of mouse paraoxonase/arylesterase*. Genomics. 1995;30(3):431- 8.
184. Aldridge WN. Serum esterases. II. *An enzyme hydrolysing diethyl p- nitrophenyl phosphate (E600) and its identity with the A-esterase of mammalian sera*. The Biochemical journal. 1953;53(1):117-24.
185. Aldridge WN. Serum esterases. I. *Two types of esterase (A and B) hydrolysing p- nitrophenyl acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination*. The Biochemical journal. 1953;53(1):110-7 .
186. Jaouad L, de Guise C, Berrougui H, et al. *Age-related decrease in high-density lipoproteins antioxidant activity is due to an alteration in the PON1's free sulfhydryl groups*. Atherosclerosis. 2006;185(1):191- 200.
187. Leviev I, Negro F, James RW. *Two alleles of the human paraoxonase gene produce different amounts of mRNA. An explanation for differences in serum concentrations of paraoxonase associated with the (Leu-Met54) polymorphism*. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. 1997;17(11):2935-9.
188. Rodriguez-Sanabria F, Rull A, Beltran-Debon R, et al. *Aragones G, Camps J, Mackness B, et al. Tissue distribution and expression of paraoxonases and chemokines in mouse: the ubiquitous and joint localisation suggest a systemic and coordinated role*. Journal of molecular histology. 2010;41(6):379-86.
189. Ng CJ, Wadleigh DJ, Gangopadhyay A, et al. *Paraoxonase-2 is a ubiquitously expressed protein with antioxidant properties and is capable of preventing cell-mediated oxidative modification of low density lipoprotein*. The Journal of biological chemistry. 2001;276(48):44444-9.
190. James RW. *A long and winding road: defining the biological role and clinical importance of paraoxonases*. Clinical chemistry and laboratory medicine. 2006;44(9):1052-9 .
191. Novak F, Vavrova L, Kodydkova J, et al. *Decreased paraoxonase activity in critically ill patients with sepsis*. Clinical and experimental medicine. 2010;10(1):21-5.

192. Mogarekar MR, Talekar SJ. *Serum lactonase and arylesterase activities in alcoholic hepatitis and hepatitis B*. *Indian journal of gastroenterology* . Official journal of the Indian Society of Gastroenterology. 2013;32(5):307-10.
193. Khersonsky O, Tawfik DS. *Chromogenic and fluorogenic assays for the lactonase activity of serum paraoxonases*. *Chembiochem : a European journal of chemical biology*. 2006;7(1):49-53.
194. Harel M, Aharoni A, Gaidukov L, et al. *Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti- atherosclerotic enzymes*. *Nature structural & molecular biology*. 2004;11(5):412-9.
195. Aharoni A, Amitai G, Bernath K, et al. *High-throughput screening of enzyme libraries: thiolactonases evolved by fluorescence-activated sorting of single cells in emulsion compartments*. *Chemistry & biology*. 2005;12(12):1281-9.
196. Aharoni A, Gaidukov L, Khersonsky O, et al. *The 'evolvability' of promiscuous protein functions*. *Nature genetics*. 2005;37(1):73-6.
197. Aharoni A, Gaidukov L, Yagur S, et al. *Directed evolution of mammalian paraoxonases PON1 and PON3 for bacterial expression and catalytic specialization*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(2):482-7.
198. Khersonsky O, Tawfik DS. *Structure-reactivity studies of serum paraoxonase PON1 suggest that its native activity is lactonase*. *Biochemistry*. 2005;44(16):6371- 82.
199. Konaklieva MI, Plotkin BJ. *Lactones: generic inhibitors of enzymes?* *Mini reviews in medicinal chemistry*. 2005;5(1):73-95.
200. Macknes, B Mackness M, Aviram M et al. *The paraoxonases: their role in disease development and xenobiotic metabolism*. Springer; 2008.
201. Khersonsky O, Tawfik DS. *The histidine 115-histidine 134 dyad mediates the lactonase activity of mammalian serum paraoxonases*. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(11):7649-56.
202. Yeung DT, Lenz DE, Cerasoli DM. *Analysis of active-site amino-acid residues of human serum paraoxonase using competitive substrates*. *The FEBS journal*. 2005;272(9):2225-30.
203. Rosenblat M, Gaidukov L, Khersonsky O, et al. *The catalytic histidine dyad of high*

- density lipoprotein-associated serum paraoxonase-1 (PON1) is essential for PON1-mediated inhibition of low density lipoprotein oxidation and stimulation of macrophage cholesterol efflux.* The Journal of biological chemistry. 2006;281(11):7657-65.
204. Playfer JR, Eze LC, Bullen MF, et al. *Genetic polymorphism and interethnic variability of plasma paraoxonase activity.* J Med Genet 1976; 13:337-42.
205. Diepgen TL, Geldmacher von Mallinkrodt M. *The human serum paraoxonase polymorphism.* Arch Toxicol Suppl 1986; 9:154-8.
206. Eckerson HW, Romson J, Wyte C, et al. *The human serum paraoxonase polymorphism: Identification of phenotypes by their response to salts.* Am J Hum Genet 1983; 35:214-2.
207. Eckerson HW, Wyte C, La Du BN. *The human serum paraoxonase/arylesterase polymorphism.* Am J Hum Genet 1983; 35:1126-38.
208. Adkins S, Gan KN, Mody M, et al. *Molecular basis for the polymorphic forms of human serum paraoxonase/arylesterase: Glutamine or arginine at position 191 for the respective A or B allonezymes.* Am J Hum Genet 1993; 52:598-608.
209. Garin MC, James RW, Dussoix P, et al. *Paraoxonase polymorphism Met-Leu 54 is associated with modified serum concentrations of the enzyme. A possible link between the paraoxonase gene and increased risk of cardiovascular disease in diabetes.* J Clin Invest 1997; 99:62-6.
210. Leviev I, James RW. *Promoter polymorphisms of human paraoxonase PON1 gene and serum paraoxonase activities and concentrations.* Arterioscler Thromb Vac Biol 2000; 20:516.
211. Brophy VH, Jampsa RL, Clendenning JB, et al. *Effects of 5' regulatory-region polymorphisms on paraoxonase-gene (PON1) expression.* Am J Hum Genet 2001; 68:1428-36.
212. Deakin S, Leviev I, Brulhart-Meynet MC, et al. *Paraoxonase-1 promoter haplotypes and serum paraoxonase: a predominant role for polymorphic position - 107, implicating Sp1 transcription factor.* Biochem J 2003; 372:643.
213. Ng CJ, Shih DM, Hama SY, et al. *The paraoxonase gene family and atherosclerosis.* Free Rad Biol Med 2005; 38:153-63.
214. Mackness MI, Mackness B. *Paraoxonase-1 and atherosclerosis: is the gene or the*

*protein more important?* Free Rad Biol Med 2004; 37:1317-23.

215. Hedrick CC, Hassan K, Hough GP, et al. *Short-term feeding of atherogenic diet to mice results in reduction of HDL and paraoxonase that may be mediated by an immune response.* Arterioscler Thromb Vasc Biol 2000; 20:1946–52.
216. Mackness M, Bouiller A, Hennuyer N, et al. *Paraoxonase activity is reduced by a pro-atherosclerotic diet in rabbits.* Biochem Biophys Res Commun 2000; 269:232–6.
217. Deakin S, James RW. *Genetic and environmental factors modulating serum concentrations and activities of the antioxidant enzyme paraoxonase-1.* Clin Sci (Lond) 2004; 107:435-47 .
218. Aviram M, Dornfeld L, Kaplan M, et al. *Pomegranate juice flavonoids inhibit low-density lipoprotein oxidation and cardiovascular diseases: studies in atherosclerotic mice and in humans.* Drugs Exp Clin Res 2002; 28:49-62.
219. Van der Gaag MS, Van Tol A, Scheek LM, et al. *Daily moderate alcohol consumption increases serum paraoxonase activity; a diet controlled, randomised intervention study in middle-aged men.* Atherosclerosis 1999; 147:405-10.
220. Ferré N, Camps J, Fernández-Ballart J, et al. *Regulation of serum paraoxonase activity by genetic, nutritional, and lifestyle factors in the general population.* Clin Chem 2003; 49:1491- 7.
221. Nishio W, Watanabe Y. *Cigarette smoke extract inhibits plasma paraoxonase activity by modification of the enzyme's free thiols.* Biochem Biophys Res Commun 1997; 236:289-93.
222. James RW, Leviev I, Righetti A. *Smoking is associated with reduced serum paraoxonase activity and concentration in patients with coronary artery disease.* Circulation 2000; 101:2252-7.
223. Wang X, Huang J, Fan Z, et al. *Genetic and environmental factors associated with plasma paraoxonase activity in healthy Chinese.* Int J Mol Med 2004; 13:445–50.

224. Senti M, Tomas M, Anglada R, et al. *Interrelationship of smoking, paraoxonase activity, and leisure time physical activity: a population based study*. Eur J Intern Med 2003; 14:178–84.
225. Seres I, Paragh G, Deschene E, et al. *Study of factors influencing the decreased HDL associated PON1 activity with aging*. Exp Gerontol 2004; 39:59–66.
226. Senti M, Tomas M, Vila J, et al. *Relationship of age-related myocardial infarction risk and Gln/Arg 192 variants of the human paraoxonase1 gene: the REGICOR study*. Atherosclerosis 2001; 156:443–9.
227. Tomás M, Sentí M, García-Faria F, et al. *Effect of simvastatin therapy on paraoxonase activity and related lipoproteins in familial hypercholesterolemic patients*. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2000; 20:2113-9.
228. Sutherland W, Manning PJ, de Jong SA, et al. *Allum AR, Jones SD, Williams SM. Hormone- replacement therapy increases serum paraoxonase arilesterase activity in diabetic postmenopausal women*. Metabolism 2001; 50:319-24.
229. Hassett C, Richter RJ, Humbert R, et al. *Characterization of cDNA clones encoding rabbit and human serum paraoxonase: the mature protein retains its signal sequence*. Biochemistry 1991; 30:10141-9.
230. Marsillach J, Mackness B, Mackness M, et al. *Riu F, Immunohistochemical analysis of paraoxonases-1, 2 and 3 expression in normal mouse tissues*. Free Rad Biol Med 2008; 45:146-57.
231. Mackness MI, Arrol S, Abbott CA, et al. *Durrington PN. Protection of low-density lipoprotein against oxidative modification by high-density lipoprotein associated paraoxonase*. Atherosclerosis 1993; 104:129-35.
232. Navab M, Berliner JA, Watson AD, et al. *The yin and yang of oxidation in the development of the fatty streak: a review based on the 1994 George Lyman Duff Memorial Lecture*. Atheroscler Thromb Vasc Biol 1996; 16:152-4.

233. Aviram M, Rosenblat M, Bisgaier CL, et al. *Newton RS, Primo-Parmo SL, La Du BN. Paraoxonase inhibits high density lipoprotein (HDL) oxidation and preserves its functions: a possible peroxidative role for paraoxonase.* J Clin Invest 1998; 101:1581- 90.
234. Mackness MI, Durrington PN, Mackness B. *How high-density lipoprotein protects against the effects of lipid peroxidation.* Curr Opin Lipidol 2000; 11:383-8.
235. Ahmed Z, Ravandi A, Maguire GF, et al. *Emili A, Draganov D, La Du BN, Kuksis A, Connelly PW. Apolipoprotein A-I promotes the formation of phosphatidylcholine core aldehydes that are hydrolyzed by paraoxonase (PON1) during high density lipoprotein oxidation with a peroxynitrite donor.* J Biol Chem 2001; 276:24473-81.
236. Sanvanich P, Mackness B, Gaskell SJ, et al. *The effect of high- density lipoproteins on the formation of lipid/protein conjugates during in vitro oxidation of low-density lipoprotein.* Biochem Biophys Res Commun 2003; 300:501-6.
237. Aviram M, Billecke S, Sorenson R, et al. *Paraoxonase active site required for protection against LDL oxidation involves its free sulfhydryl group and is different from that required for its arylesterase/paraoxonase activities: selective action of human paraoxonase allozymes Q and R.* Arterioscler Thromb Vasc Biol 1998; 18:1617-24.
238. Shih DM, Gu L, Xia YR, et al. *Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis.* Nature 1998; 394:284-7.
239. Shih DM, Xia YR, Miller E, et al. *Combined serum paraoxonase knockout/apolipoprotein E knockout mice exhibit increased lipoprotein oxidation and atherosclerosis.* J Biol Chem 2000; 275:17527-35.
240. Tward A, Xia YR, Wang XP, et al. *Shi YS, Park C, Castellani LW, Lusis AJ, Shih DM. Decreased atherosclerotic lesion formation in human serum paraoxonase transgenic mice.* Circulation 2002; 106:484-90.
241. Oda MN, Bielicki JK, Ho TT, et al. *Paraoxonase-1 overexpression in mice and its effect of high-density lipoproteins.* Biochem Biophys Res Commun 2002; 290:921-7.

242. Teiber JF, Draganov DI, La DU BN. *Purified human serum PON1 does not protect LDL against oxidation in the in vitro assays initiated with copper or AAPH*. J Lip Res 2004; 45:2260-8.
243. Rosenblat M, Karry R, Aviram M. *Paraoxonase-1 (PON1) is a more potent antioxidant and stimulant of macrophage cholesterol efflux, when present in HDL than in lipoprotein-deficient seum: Relevance to diabetes*. Atherosclerosis 2006; 187:74.e1- e10.
244. Rozenberg O, Shiner M, Aviram M, et al. *Paraoxonase-1 (PON1) attenuates diabetes development in mice through its antioxidative properties*. Free Rad Biol Med 2008; 44:1951:9.
245. Liu Y, Mackness B, Mackness M. *Comparison of the ability of paraoxonases-1 and 3 to attenuate the in vitro oxidation of low-density lipoprotein and reduce macrophage oxidative stress*. Free Rad Biol Med 2008; 45:743-8.
246. Draganov DI, La Du BN. *Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 2004; 369:78-88.
247. Furlong CE. *Paraoxonases: An historical perspective*. In Mackness B, Mackness M, Aviram M, Paragh G, Eds. *The Paraoxonases: Their Role in Disease Development and Xenobiotic Metabolism*. Pp 3-31. Dordrecht: Springer, 2008.
248. Jensen RA. *Enzyme recruitment in the evolution of new function*. Annu Rev Microbiol 1974; 30:409-25.
249. O'Brien PJ, Herschlag D. *Catalytic promiscuity and the evolution of new enzymatic activities*. Chem Biol 1999; 6R91-R105.
250. Copley SD. *Enzymes with extra talents: moonlighting functions and catalytic promiscuity*. Curr Opin Chem Biol 2003; 7:265-72.
251. Khersonsky O, Roodveldt C, Tawfik DS. *Enzyme promiscuity: evolutionary and mechanistic aspects*. Curr Opin Chem Biol 2006; 10:498-508.

252. Teiber JF, Draganov DI, La Du BN. *Lactonase and lactonizing activities of human serum paraoxonase (PON1) and rabbit serum PON3*. *Biochem Pharmacol* 2003; 66:887- 96.
253. Jakubowski H. *Calcium-dependent human serum homocysteine thiolactone hydrolase. A protective mechanism against protein N-homocysteinylation*. *J Biol Chem* 2000; 275:3957-62.
254. Davies HG, Richter RJ, Keifer M, Broomfield CA, Sowalla J, Furlong CE. *The effect of the human serum paraoxonase polymorphism is reversed with diazoxon, soman and sarin*. *Nat Genet* 1996; 14: 334-6.
255. Teiber JF, Billecke S, La Du BN, Draganov DI. *Estrogen esters as substrates for human paraoxonases*. *Arch Biochem Biophys* 2007; 461:24-9.
256. La Du BN, Aviram M, Billecke S, Navab M, Primo-Parmo S, Sorenson RC, Standiford TJ. *On the physiological role(s) of the paraoxonases*. *Chem Biol Interact* 1999; 119-120:379-88.
257. Biggadike K, Angell RM, Burgess CM, Farrell RM, Hancock AP, Harker AJ, Irving WR, Ioannou C, Procopiou PA, Shaw RE, Solanke YE, Singh OM, Snowden MA, Stubbs RJ, Walton S, Weston HE. *Selective plasma hydrolysis of glucocorticoid gamma-lactones and cyclic carbonates by the enzyme paraoxonase: an ideal plasma inactivation mechanism*. *J Med Chem* 2000; 43:19-21.
258. Harel M, Aharoni A, Gaidukov L, Brunshtein B, Khersonsky O, Meged R, Dvir H, Ravelli RB, McCarthy A, Toker L, Silman I, Sussman JL, Tawfik DS. *Structure and evolution of the human serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes*. *Nat Struct Mol Biol* 2004; 11:412-9.
259. Kuo CL, La Du BN. *Calcium binding by human and rabbit serum paraoxonases. Structural stability and enzymatic activity*. *Drug Metab. Dispos* 1998; 26,653–60.
260. Aharoni A, Gaidukov L, Yagur S, Toker L, Silman I, Tawfik DS. *Directed evolution of*

*mammalian paraoxonases PON1 and PON3 for bacterial expression and catalytic specialization.* Proc Natl Acad Sci USA 2004; 101:482-7.

261. Aharoni A, Gaidukov L, Khersonsky O, McQGould S, Roodveldt C, Tawfik DS. *The 'evolvability' of promiscuous protein functions.* Nat Genet 2005; 37:73-6.
262. Khersonsky O, Tawfik DS. *Structure-reactivity studies of serum paraoxonase PON1 suggest that its native activity is lactonase.* Biochemistry 2005; 44:6371-82.
263. Aharoni A, Amitai G, Bernarth K, Magdassi S, Tawfik DS. *High-throughput screening of enzyme libraries: thiolactonases evolved by fluorescence-activated sorting of single cells in emulsion compartments.* Chem Biol 2005; 12:1281-9.
264. Khersonsky O, Tawfik DS. *The histidine 115-histidine 134 mediates the lactonase activity of mammalian serum paraoxonases.* J Biol Chem 2006; 281:7649-56.
265. Rosenblat M, Gaidukov L, Khersonsky O, Vaya J, Oren R, Tawfik DS, Aviram M. *The catalytic histidine dyad of high density lipoprotein-associated serum paraoxonase-1 (PON1) is essential for PON1-mediated inhibition of low density lipoprotein oxidation and stimulation of macrophage cholesterol efflux.* J Biol Chem 2006; 182:7657-65.
266. Navab M, Ananthramaiah GM, Reddy ST, Van Lenten BJ, Ansell BJ, Fonarow GC, Vahabzadeh K, Hama S, Hough G, Kamranpour N, Berliner JA, Lusis AJ, Fogelman AM. *The oxidation hypothesis of atherogenesis: the role of oxidized phospholipids and HDL.* J Lip Res 2004; 45:993-1007.
267. Navab M, Hama SY, Cooke CJ, Ananthramaiah GM, Chaddha M, Jin L, Subbanagounder G, Faull KF, Reddy ST, Miller NE, Fogelman AM. *Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: step 1.* J Lip Res 2000; 41:1481-4.
268. Navab M, Hama SY, Ananthramaiah GM, Hassan K, Hough GP, Watson AD, Reddy ST, Sevanian A, Fonarow GC, Fogelman AM. *Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: steps 2 and 3.* J Lip Res

2000; 41:1485-1508.

269. Negre-Salvayre A, Dousset N, Ferretti G, Bacchetti T, Curatola G, Salvayre R. *Antioxidant and cytoprotective properties of high-density lipoproteins in vascular cells*. Free Radic Biol Med 2006; 41:1031-40.
270. Barter PJ, Nicholls S, Rye KA, Ananthramaiah GM, Navab M, Fogelman AM. *Antiinflammatory Properties of HDL*. Circ Res 2004; 95: 764-72.
271. Charo IF, Ransohoff RM. *The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation*. N Engl J Med 2006; 354:610-21.
272. Leonarduzzi G, Chiarpotto E, Biasi F, Poli G. *4-hydroxynonenal and cholesterol oxidation products in atherosclerosis*. Mol Nutr Food Res 2005; 49:1044-9.
273. Navab M, Berliner JA, Subbanagounder G, et al. *HDL and the inflammatory response induced by LDL-derived oxidised phospholipids*. Artherosclerosis, Thrombosis, and vascular Biology. 2001; 21:481-8.
274. Navab M, Imes SS, Hama SY, Hough GP, Ross LA, Bork RW, Valente AJ, Berliner JA, Drinkwater DC, Laks H, Fogelman AM. *Monocyte transmigration induced by modification of low density lipoprotein in co-cultures of human aortic wall cells is due to induction of monocyte chemotactic protein 1 synthesis and is abolished by high density lipoprotein*. J Clin Invest 1991; 88:2039-46.
275. Mackness B, Hine D, Liu Y, Mastorikou M, Mackness MI. *Paraoxonase-1 inhibits oxidised LDL-induced MCP-1 production by endothelial cells*. Biochem Biophys Res Commun 2004; 318:680-3.
276. Tward A, Xia YR, Wang XP, Shi YS, Park C, Castellani LW, Lusis AJ, Shih DM. *Decreased atherosclerotic lesion formation in human serum paraoxonase transgenic mice*. Circulation 2002; 106:484-90.
277. Mackness B, Quarck R, Verreth W, Mackness MI, Holvoet P. *Human paraoxonase-1 overexpression inhibits atherosclerosis in a mouse model of metabolic syndrome*. Arterioscl Thromb Vasc Biol 2006; 26:1545-50.

278. Rosenblat M, Vaya J, Shih DM, Aviram M. *Paraoxonase 1 (PON1) enhances HDL-mediated macrophage cholesterol efflux via the ABCA1 transporter in association with increased HDL binding to the cells: a possible role for lysophosphatidylcholine.* *Atherosclerosis* 2005; 179:69-77.
279. Bergmeier C, Siekmeier R, Gross W. *Distribution spectrum of paraoxonase activity in HDL fractions.* *Clin Chem* 2004; 50:2309-15.
280. Ribas V, Sánchez-Quesada J, Antón R, Camacho M, Julve J, Escolà-Gil JC, Vila L, Ordóñez-Llanos J, Blanco-Vaca F. *Human apolipoprotein A-II enrichment displaces paraoxonase from HDL and impairs its antioxidant properties. A new mechanism linking HDL protein composition and antiatherogenic potential.* *Circ Res* 2004; 95:789-97.
281. Khovidhunkit W, Memon RA, Feingold KR, Grunfeld C. *Infection and inflammation-induced proatherogenic changes of lipoproteins.* *J Infect Dis* 2000; 181:S462-72.
282. Van Lenten BJ, Hama SY, De Beer FC, Stafforini DM, McIntyre TM, Prescott SM, La Du BN, Fogelman AM, Navab M. *Anti-inflammatory HDL become pro-inflammatory during the acute phase response.* *J Clin Invest* 1995; 96:2758-67.
283. Feingold KR, Memon RA, Mosser AH, Grunfeld C. *Paraoxonase activity in the serum and hepatic mRNA levels decrease during the acute phase response.* *Atherosclerosis* 1998; 139:307-15.
284. Draganov DI, La Du BN. *Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review.* *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology.* 2004;369(1):78-88.
285. Draganov DI, Teiber JF, Speelman A, Osawa Y, Sunahara R, La Du BN. *Human paraoxonases (PON1, PON2, and PON3) are lactonases with overlapping and distinct substrate specificities.* *Journal of lipid research.* 2005;46(6):1239-47.
286. Ng CJ, Bourquard N, Grijalva V, Hama S, Shih DM, Navab M, et al. *Paraoxonase-2 deficiency aggravates atherosclerosis in mice despite lower apolipoprotein-B-containing lipoproteins: anti-atherogenic role for paraoxonase-2.* *The Journal of biological chemistry.* 2006;281(40):29491-500.
287. Meilin E, Aviram M, Hayek T. *Paraoxonase 2 (PON2) decreases high glucose-induced macrophage triglycerides (TG) accumulation, via inhibition of NADPH- oxidase and DGAT1 activity: studies in PON2-deficient mice.* *Atherosclerosis.* 2010;208(2):390-5.
288. Rosenblat M, Coleman R, Reddy ST, Aviram M. *Paraoxonase 2 attenuates*

- macrophage triglyceride accumulation via inhibition of diacylglycerol acyltransferase 1.* Journal of lipid research. 2009;50(5):870-9.
289. Juhas M, Eberl L, Tummler B.. Environmental microbiology. 2005;7(4):459-71.
290. Stoltz DA, Ozer EA, Ng CJ, Yu JM, Reddy ST, Lusis AJ, et al. *Paraoxonase-2 deficiency enhances Pseudomonas aeruginosa quorum sensing in murine tracheal epithelia.* American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology. 2007;292(4):L852-60.
291. Witte I, Foerstermann U, Devarajan A, Reddy ST, Horke S. *Protectors or Traitors: The Roles of PON2 and PON3 in Atherosclerosis and Cancer.* Journal of lipids. 2012;2012:342806.
292. Li Y, Li Y, Tang R, Xu H, Qiu M, Chen Q, et al. *Discovery and analysis of hepatocellular carcinoma genes using cDNA microarrays.* Journal of cancer research and clinical oncology. 2002;128(7):369-79.
293. Ribarska T, Ingenwerth M, Goering W, Engers R, Schulz WA. *Epigenetic inactivation of the placentally imprinted tumor suppressor gene TFPI2 in prostate carcinoma.* Cancer genomics & proteomics. 2010;7(2):51-60.
294. Ross ME, Zhou X, Song G, Shurtleff SA, Girtman K, Williams WK, et al. *Classification of pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling.* Blood. 2003;102(8):2951-9.
295. Altenhofer S, Witte I, Teiber JF, Wilgenbus P, Pautz A, Li H, et al. *One enzyme, two functions: PON2 prevents mitochondrial superoxide formation and apoptosis independent from its lactonase activity.* The Journal of biological chemistry. 2010;285(32):24398-403.
296. Rosenblat M, Volkova N, Aviram M. *Macrophage endoplasmic reticulum (ER) proteins and reducing elements stabilize paraoxonase 2 (PON2).* Atherosclerosis. 2010;213(2):408-14.
297. Horke S, Witte I, Wilgenbus P, Kruger M, Strand D, Forstermann U. *Paraoxonase-2 reduces oxidative stress in vascular cells and decreases endoplasmic reticulum stress-induced caspase activation.* Circulation. 2007;115(15):2055-64.
298. Horke S, Witte I, Wilgenbus P, Altenhofer S, Kruger M, Li H, et al. *Protective effect of paraoxonase-2 against endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis is lost upon disturbance of calcium homeostasis.* The Biochemical journal. 2008;416(3):395-405.
299. Devarajan A, Grijalva VR, Bourquard N, Meriwether D, 3rd, Imaizumi S, Shin BC, et

- al. *Macrophage paraoxonase 2 regulates calcium homeostasis and cell survival under endoplasmic reticulum stress conditions and is sufficient to prevent the development of aggravated atherosclerosis in paraoxonase 2 deficiency/apoE-/- mice on a Western diet.* Molecular genetics and metabolism. 2012;107(3):416-27.
300. Hegele RA, Connelly PW, Scherer SW, Hanley AJ, Harris SB, Tsui LC, et al. *Paraoxonase-2 gene (PON2) G148 variant associated with elevated fasting plasma glucose in noninsulin-dependent diabetes mellitus.* The Journal of clinical endocrinology and metabolism. 1997;82(10):3373-7.
301. Boright AP, Connelly PW, Brunt JH, Scherer SW, Tsui LC, Hegele RA. *Genetic variation in paraoxonase-1 and paraoxonase-2 is associated with variation in plasma lipoproteins in Alberta Hutterites.* Atherosclerosis. 1998;139(1):131-6.
302. Sanghera DK, Aston CE, Saha N, Kamboh MI. *DNA polymorphisms in two paraoxonase genes (PON1 and PON2) are associated with the risk of coronary heart disease.* American journal of human genetics. 1998;62(1):36-44.
303. Stoltz DA, Ozer EA, Recker TJ, Estin M, Yang X, Shih DM, et al. *A common mutation in paraoxonase-2 results in impaired lactonase activity.* The Journal of biological chemistry. 2009;284(51):35564-71.
304. Li BH, Zhang LL, Yin YW, Pi Y, Yang QW, Gao CY, et al. *Association between paraoxonase 2 Ser311Cys polymorphism and ischemic stroke risk: a meta-analysis involving 5,008 subjects.* Molecular biology reports. 2012;39(5):5623-30.
305. Thameem F, He X, Voruganti VS, Nath SD, Fanti P, Blangero J, et al. *Evaluation of polymorphisms in paraoxonase 2 (PON2) gene and their association with cardiovascular-renal disease risk in Mexican Americans.* Kidney & blood pressure research. 2009;32(3):200-4.
306. Draganov DI, Stetson PL, Watson CE, Billecke SS, La Du BN. *Rabbit serum paraoxonase 3 (PON3) is a high density lipoprotein-associated lactonase and protects low density lipoprotein against oxidation.* The Journal of biological chemistry. 2000;275(43):33435-42.
307. Reddy ST, Devarajan A, Bourquard N, Shih D, Fogelman AM. *Is it just paraoxonase 1 or are other members of the paraoxonase gene family implicated in atherosclerosis?* Current opinion in lipidology. 2008;19(4):405-8.

308. Reddy ST, Wadleigh DJ, Grijalva V, Ng C, Hama S, Gangopadhyay A, et al. *Human paraoxonase-3 is an HDL-associated enzyme with biological activity similar to paraoxonase-1 protein but is not regulated by oxidized lipids*. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. 2001;21(4):542-7.
309. Shih DM, Xia YR, Yu JM, et al. *Temporal and tissue-specific patterns of Pon3 expression in mouse: in situ hybridization analysis*. Advances in experimental medicine and biology. 2010;660:73-87.
310. Shih DM, Xia YR, Wang XP, et al. *Decreased obesity and atherosclerosis in human paraoxonase 3 transgenic mice*. Circulation research. 2007;100(8):1200-7.
311. Schweikert EM, Devarajan A, Witte I, et al. *PON3 is upregulated in cancer tissues and protects against mitochondrial superoxide-mediated cell death*. Cell death and differentiation. 2012;19(9):1549-60.
312. World Health Organization. *Cardiovascular diseases (CDVs) 2015*. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>
313. Libby P. *Inflammation in atherosclerosis*. Nature. 2002;420(6917):868-74.
314. Ross R. *Atherosclerosis--an inflammatory disease*. The New England journal of medicine. 1999;340(2):115-26.
315. Hansson GK, Libby P, Schonbeck U, et al. *Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis*. Circulation research. 2002;91(4):281-91.
316. Tabas I, Williams KJ, Boren J. *Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis: update and therapeutic implications*. Circulation. 2007;116(16):1832-44.
317. Stephen SL, Freestone K, Dunn S, et al. *Scavenger receptors and their potential as therapeutic targets in the treatment of cardiovascular disease*. International journal of hypertension. 2010;2010:646929.
318. Libby P, Ridker PM, Hansson GK. *Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis*. Nature. 2011;473(7347):317-25.
319. Galkina E, Ley K. *Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis (\*)*. Annual review of immunology. 2009;27:165-97.
320. Fenyó IM, Gafencu AV. *The involvement of the monocytes/macrophages in chronic inflammation associated with atherosclerosis*. Immunobiology. 2013;218(11):1376-84.

321. Simpson KJ, Henderson NC, Bone-Larson CL, et al. *Chemokines in the pathogenesis of liver disease: so many players with poorly defined roles*. Clinical science. 2003;104(1):47-63.
322. Lin J, Kakkar V, Lu X. *Impact of MCP-1 in atherosclerosis*. Current pharmaceutical design. 2014;20(28):4580-8.
323. Nelken NA, Coughlin SR, Gordon D, Wilcox JN. *Monocyte chemoattractant protein-1 in human atheromatous plaques*. The Journal of clinical investigation. 1991;88(4):1121-7.
324. Yu X, Druz S, Graves DT, et al. *Elevated expression of monocyte chemoattractant protein 1 by vascular smooth muscle cells in hypercholesterolemic primates*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1992;89(15):6953-7.
325. Steinberg D, Lewis A. *Conner Memorial Lecture. Oxidative modification of LDL and atherogenesis*. Circulation. 1997;95(4):1062-71.
326. Cushing SD, Berliner JA, Valente AJ, et al. *Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1990;87(13):5134-8.
327. Hashizume M, Mihara M. *Blockade of IL-6 and TNF-alpha inhibited oxLDL- induced production of MCP-1 via scavenger receptor induction*. European journal of pharmacology. 2012;689(1-3):249-54.
328. Gonzalez-Quesada C, Frangogiannis NG. *Monocyte chemoattractant protein-1/CCL2 as a biomarker in acute coronary syndromes*. Current atherosclerosis reports. 2009;11(2):131-8.
329. Navab M, Hama SY, Anantharamaiah GM, et al. *Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: steps 2 and 3*. Journal of lipid research. 2000;41(9):1495-508.
330. Navab M, Hama SY, Cooke CJ et al. *Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: step 1*. Journal of lipid research. 2000;41(9):1481- 94.
331. Negre-Salvayre A, Dousset N, Ferretti G, et al. *Antioxidant and cytoprotective properties of high-density lipoproteins in vascular cells*. Free radical biology & medicine. 2006;41(7):1031-40.

332. Stannard AK, Khan S, Graham A, Owen JS, et al. *Inability of plasma high-density lipoproteins to inhibit cell adhesion molecule expression in human coronary artery endothelial cells*. *Atherosclerosis*. 2001;154(1):31-8.
333. Gaidukov L, Tawfik DS. *High affinity, stability, and lactonase activity of serum paraoxonase PON1 anchored on HDL with ApoA-I*. *Biochemistry*. 2005;44(35):11843-54.
334. Riwanto M., Landmesser U. *High density lipoproteins and endothelial functions: mechanistic insights and alterations in cardiovascular disease*. *J. Lipid Res*. 2013 54:(12) 3227-3243.
335. Aviram M, Rosenblat M, Bisgaier CL, et al. *Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase*. *The Journal of clinical investigation*. 1998;101(8):1581-90.
336. Watson AD, Berliner JA, Hama SY, et al. *Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase. Inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein*. *The Journal of clinical investigation*. 1995;96(6):2882-91.
337. Mackness B, Hine D, Liu Y, et al. *Paraoxonase-1 inhibits oxidised LDL-induced MCP-1 production by endothelial cells*. *Biochemical and biophysical research communications*. 2004;318(3):680-3.
338. Tward A, Xia YR, Wang XP, et al. *Decreased atherosclerotic lesion formation in human serum paraoxonase transgenic mice*. *Circulation*. 2002;106(4):484-90.
339. Rozenberg O, Rosenblat M, Coleman R, et al. *Paraoxonase (PON1) deficiency is associated with increased macrophage oxidative stress: studies in PON1-knockout mice*. *Free radical biology & medicine*. 2003;34(6):774-84.
340. Rosenblat M, Vaya J, Shih D, et al. *Paraoxonase 1 (PON1) enhances HDL-mediated macrophage cholesterol efflux via the ABCA1 transporter in association with increased HDL binding to the cells: a possible role for lysophosphatidylcholine*. *Atherosclerosis*. 2005;179(1):69-77.
341. Moore RE, Navab M, Millar JS, et al. *Increased atherosclerosis in mice lacking apolipoprotein A-I attributable to both impaired reverse cholesterol transport and increased inflammation*. *Circulation research*. 2005;97(8):763-71.
342. Camps J, Garcia-Heredia A, Rull A, et al. *PPARs in Regulation of Paraoxonases: Control of Oxidative Stress and Inflammation Pathways*. *PPAR research*.

2012;2012:616371.

343. Baynes JW. *Role of oxidative stress in development of complications in diabetes*. Diabetes. 1991;40(4):405-12.
344. Brownlee M. *Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications*. Nature. 2001;414(6865):813-20.
345. Ceriello A. *Oxidative stress and glycemic regulation*. Metabolism: clinical and experimental. 2000;49(2 Suppl 1):27-9.
346. Opara EC. *Oxidative stress, micronutrients, diabetes mellitus and its complications*. The journal of the Royal Society for the Promotion of Health. 2002;122(1):28-34.
347. James RW, Leviev I, Ruiz J, et al. *Promoter polymorphism T(-107)C of the paraoxonase PON1 gene is a risk factor for coronary heart disease in type 2 diabetic patients*. Diabetes. 2000;49(8):1390-3.
348. Letellier C, Durou MR, Jouanolle AM, et al. *Serum paraoxonase activity and paraoxonase gene polymorphism in type 2 diabetic patients with or without vascular complications*. Diabetes & metabolism. 2002;28(4 Pt 1):297-304.
349. Mastorikou M, Mackness B, Liu Y, Mackness M. *Glycation of paraoxonase-1 inhibits its activity and impairs the ability of high-density lipoprotein to metabolize membrane lipid hydroperoxides*. Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association. 2008;25(9):1049-55.
350. Mastorikou M, Mackness M, Mackness B. *Defective metabolism of oxidized phospholipid by HDL from people with type 2 diabetes*. Diabetes. 2006;55(11):3099-103.
351. Rozenberg O, Shiner M, Aviram M, et al. *Paraoxonase 1 (PON1) attenuates diabetes development in mice through its antioxidative properties*. Free radical biology & medicine. 2008;44(11):1951-9.
352. Karabina SA, Lehner AN, Frank E, et al. *Oxidative inactivation of paraoxonase implications in diabetes mellitus and atherosclerosis*. Biochimica et biophysica acta. 2005;1725(2):213-21.
353. Rosenblat M, Hayek T, Aviram M. *Anti-oxidative effects of pomegranate juice (PJ) consumption by diabetic patients on serum and on macrophages*. Atherosclerosis. 2006;187(2):363-71.
354. Rock W, Rosenblat M, Miller-Lotan R, et al. *Consumption of wonderful variety*

- pomegranate juice and extract by diabetic patients increases paraoxonase 1 association with high-density lipoprotein and stimulates its catalytic activities.* Journal of agricultural and food chemistry. 2008;56(18):8704-13.
355. Aviram M, Rosenblat M, Bisgaier CL, et al. *Atorvastatin and gemfibrozil metabolites, but not the parent drugs, are potent antioxidants against lipoprotein oxidation.* Atherosclerosis. 1998;138(2):271-80.
356. Graham GG, Punt J, Arora M, et al. *Clinical pharmacokinetics of metformin.* Clinical pharmacokinetics. 2011;50(2):81-98.
357. Inzucchi SE, Bergenstal RM, Buse JB, et al. *Management of hyperglycemia in type 2 diabetes, 2015: a patient-centered approach: update to a position statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes.* Diabetes care. 2015;38(1):140-9.
358. Rojas LB, Gomes MB. *Metformin: an old but still the best treatment for type 2 diabetes.* Diabetology & metabolic syndrome. 2013;5(1):6.
359. Ali S, Fonseca V. *Overview of metformin: special focus on metformin extended release.* Expert opinion on pharmacotherapy. 2012;13(12):1797-805.
360. Kita Y, Takamura T, Misu H, et al. *Metformin prevents and reverses inflammation in a non-diabetic mouse model of nonalcoholic steatohepatitis.* PloS one. 2012;7(9):e43056.
361. Mahmood K, Naeem M, Rahimnajjad NA. *Metformin: the hidden chronicles of a magic drug.* European journal of internal medicine. 2013;24(1):20-6.
362. Mazza A, Fruci B, Garinis GA, et al. *The role of metformin in the management of NAFLD.* Experimental diabetes research. 2012;2012:716404.
363. Zhou G, Myers R, Li Y, et al. *Role of AMP- activated protein kinase in mechanism of metformin action.* The Journal of clinical investigation. 2001;108(8):1167-74.
364. Hardie DG. *AMPK: positive and negative regulation, and its role in whole- body energy homeostasis.* Current opinion in cell biology. 2015;33:1-7.
365. Faure P, Rossini E, Wiernsperger N, et al. *An insulin sensitizer improves the free radical defense system potential and insulin sensitivity in high fructose-fed rats.* Diabetes. 1999;48(2):353-7.
366. Beisswenger P, Ruggiero-Lopez D. *Metformin inhibition of glycation processes.* Diabetes & metabolism. 2003;29(4 Pt 2):6S95-103.

367. Fang DH, Fan CH, Ji Q, et al. *Differential effects of paraoxonase 1 (PON1) polymorphisms on cancer risk: evidence from 25 published studies*. *Molecular biology reports*. 2012;39(6):6801-9.
368. Saadat M. *Paraoxonase 1 genetic polymorphisms and susceptibility to breast cancer: a meta-analysis*. *Cancer epidemiology*. 2012;36(2):e101-3.
369. World Health Organization. *Neurological disorders 2006*. Available from: [http://www.who.int/mental\\_health/neurology/neurological\\_disorders\\_report\\_web.pdf](http://www.who.int/mental_health/neurology/neurological_disorders_report_web.pdf).
370. Reitz C, Mayeux R. *Alzheimer disease: epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers*. *Biochemical pharmacology*. 2014;88(4):640-51.
371. Paragh G, Balla P, Katona E, et al. *Serum paraoxonase activity changes in patients with Alzheimer's disease and vascular dementia*. *European archives of psychiatry and clinical neuroscience*. 2002;252(2):63-7.
372. Wehr H, Bednarska-Makaruk M, Graban A, et al. *Paraoxonase activity and dementia*. *Journal of the neurological sciences*. 2009;283(1-2):107-8.
373. Wingo TS, Rosen A, Cutler DJ, et al. *Paraoxonase-1 polymorphisms in Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and AD-PD spectrum diseases*. *Neurobiology of aging*. 2012;33(1):204 e13-5.
374. He XM, Zhang ZX, Zhang JW, et al. *Gln192Arg polymorphism in paraoxonase 1 gene is associated with Alzheimer disease in a Chinese Han ethnic population*. *Chinese medical journal*. 2006;119(14):1204-9.
375. Pi Y, Zhang L, Chang K, et al. *Lack of an association between Paraoxonase 1 gene polymorphisms (Q192R, L55M) and Alzheimer's disease: a meta-analysis*. *Neuroscience letters*. 2012;523(2):174-9.
376. Park NH. *Parkinson disease*. *JAAPA : official journal of the American Academy of Physician Assistants*. 2012;25(5):73-4.
377. Le Couteur DG, McLean AJ, Taylor MC, et al. *Pesticides and Parkinson's disease*. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 1999;53(3):122-30.
378. Kamel F, Hoppin JA. *Association of pesticide exposure with neurologic dysfunction and disease*. *Environmental health perspectives*. 2004;112(9):950-8.
379. Liu YL, Yang J, Zheng J, et al. *Paraoxonase 1 polymorphisms L55M and Q192R were not risk factors for Parkinson's disease: a HuGE review and meta-analysis*. *Gene*.

2012;501(2):188-92.

380. Lee PC, Rhodes SL, Sinsheimer JS, et al. *Functional paraoxonase 1 variants modify the risk of Parkinson's disease due to organophosphate exposure*. Environment international. 2013;56:42-7.
381. Dardiotis E, Xiromerisiou G, Hadjichristodoulou C, et al. *The interplay between environmental and genetic factors in Parkinson's disease susceptibility: the evidence for pesticides*. Toxicology. 2013;307:17-23.
382. World Health Organization. *Obesity and overweight 2015*. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en>.
383. Camps J, Rodriguez-Gallego E, Garcia-Heredia A, et al. *Paraoxonases and chemokine (C-C motif) ligand-2 in noncommunicable diseases*. Advances in clinical chemistry. 2014;63:247-308.
384. Masarone M, Federico A, Abenavoli L, et al. *Non alcoholic fatty liver: epidemiology and natural history*. Reviews on recent clinical trials. 2014;9(3):126-33.
385. Vernon G, Baranova A, Younossi ZM. *Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults*. Alimentary pharmacology & therapeutics. 2011;34(3):274- 85.
386. Karbasi-Afshar R, Saburi A, Khedmat H. *Cardiovascular disorders in the context of non-alcoholic Fatty liver disease: a literature review*. The journal of Tehran Heart Center. 2014;9(1):1-8.
387. Cohen JC, Horton JD, Hobbs HH. *Human fatty liver disease: old questions and new insights*. Science. 2011;332(6037):1519-23.
388. Than NN, Newsome PN. *A concise review of non-alcoholic fatty liver disease*. Atherosclerosis. 2015;239(1):192-202.
389. Armstrong MJ, Adams LA, Canbay A, et al. *Extrahepatic complications of nonalcoholic fatty liver disease*. Hepatology. 2014;59(3):1174-97.
390. Fabbrini E, Sullivan S, Klein S. *Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: biochemical, metabolic, and clinical implications*. Hepatology. 2010;51(2):679-89.
391. Hassan K, Bhalla V, El Regal ME, et al. *Nonalcoholic fatty liver disease: a comprehensive review of a growing epidemic*. World journal of gastroenterology. 2014;20(34):12082-101.

392. Ferre N, Camps J, Prats E, et al. *Serum paraoxonase activity: a new additional test for the improved evaluation of chronic liver damage*. Clinical chemistry. 2002;48(2):261-8.
393. Kelso GJ, Stuart WD, Richter RJ, et al. *Apolipoprotein J is associated with paraoxonase in human plasma*. Biochemistry. 1994 25;33(3):832-9.
394. Mackness B, Durrington PN, Mackness MI. *Human serum paraoxonase*. General pharmacology. 1998;31(3):329-36.
395. Ferre N, Camps J, Cabre M, et al. *Hepatic paraoxonase activity alterations and free radical production in rats with experimental cirrhosis*. Metabolism: clinical and experimental. 2001;50(9):997-1000.
396. Burlina A, Galzigna L. *Serum arylesterase isoenzymes in chronic hepatitis*. Clinical biochemistry. 1974;7(3):202-5 .
397. Burlina A, Michielin E, Galzigna L. *Characteristics and behaviour of arylesterase in human serum and liver*. European journal of clinical investigation. 1977;7(1):17-20.
398. Kawai H, Sakamoto F, Inoue Y. *Improved specific assay for serum arylesterase using a water-soluble substrate*. Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry. 1990;188(2):177-82.
399. Ferre N, Marsillach J, Camps J, et al. *Genetic association of paraoxonase-1 polymorphisms and chronic hepatitis C virus infection*. Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry. 2005;361(1-2):206- 10.
400. Adams LA, Angulo P. *Role of liver biopsy and serum markers of liver fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease*. Clinics in liver disease. 2007;11(1):25-35.
401. Stinton LM, Loomba R. *Recommendations for liver biopsy evaluation in non-alcoholic fatty liver disease*. Minerva gastroenterologica e dietologica. 2014;60(1):5- 13
402. Marsillach J, Ferre N, Vila MC, et al. *Serum paraoxonase-1 in chronic alcoholics: relationship with liver disease*. Clinical biochemistry. 2007;40(9-10):645-50.
403. Soler N, Garcia-Heredia A, Marsillach J, et al. *Paraoxonase-1 is associated with corneal endothelial cell alterations in patients with chronic obstructive pulmonary disease*. Inv Ophthalmol Vis Sci. 2013;54(8):5852-8.
404. Nowak M, Wielkoszyński T, Marek Kos-Kudła B, et al. *Antioxidant potential, paraoxonase 1, ceruloplasmin activity and C-reactive protein concentration in diabetic retinopathy*. Clin Exp Med. 2010;10(3):185-92.

405. Mitchell P, Smith W, Chey T, et al. . *Prevalence and associations of epiretinal membranes. The Blue Mountains Eye Study, Australia.* Ophthalmology 1997; 104:1033-40.
406. Fraser-Bell S, Guzowski M, Rochtchina E, et al. . *Five-year cumulative incidence and progression of epiretinal membranes: the Blue Mountains Eye Study.* Ophthalmology 2003; 110:34-40.
407. Durrington PN, Mackness B, Mackness MI. *Paraoxonase and atherosclerosis. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2001 21: 473–480.*
408. Lyons TJ, Li W, Wells-Knecht, MC, Jokl R. *Toxicity of mildly modified low-density lipoproteins to cultured retinal capillary endothelial cells and pericytes.* Diabetes, 1994; 43:1090–1095.
409. Santos JM, Mohammad G, Zhong Q, Kowluru RA. *Diabetic retinopathy, superoxide damage and antioxidants.* Curr Pharm Biotechnol. 2011; 12 (3):352-361.
410. Kowluru RA, Zhong Q. *Beyond AREDS: is there a place for antioxidant therapy in the prevention/treatment of eye disease?* Invest Ophthalmol Vis Sci. 2011; 52 (12) :8665-867.



ANNEX

---

## Original

# Estudio de los valores de la paraoxonasa y su actividad en suero y humor vítreo de pacientes diabéticos

## Study of paraoxonasa values and their activity in serum and vitreous humor of diabetic patients

**P. Pujol Gomis, P. Romero Aroca**

*Hospital Universitario Sant Joan de Reus. Reus. Tarragona.*

### Correspondencia:

Patricia Pujol Gomis

E-mail: [patrereus@hotmail.com](mailto:patrereus@hotmail.com)

### Resumen

Las enzimas de la familia de la PON (paraoxonasa) degradan peróxidos lipídicos, lo que implica que estas enzimas podrían afectar de forma importante una gran variedad de enfermedades en las que estén involucradas alteraciones en el balance redox y producir un aumento del estrés oxidativo. Se han descrito alteraciones en los niveles circulantes de PON 1 en varias enfermedades, en las que el estrés oxidativo está involucrado. El estudio intenta demostrar la modificación de los valores de PON en los diabéticos y la consecuencia de éste cambio, tanto a nivel de suero/plasma, donde ya se habían hecho estudios al respecto, como a nivel de humor vítreo, donde no hay estudios todavía descritos. Se encuentran resultados con significación estadística en los ojos con edema macular diabético (EMDBT), que, respecto a los que no tienen, presentan niveles aumentados en humor vítreo de PON1 y 3 y sus actividades, y valores a la inversa en suero/plasma, hecho que apoya la hipótesis de que existe una producción intraocular como respuesta a intentar frenar el grado de inflamación asociada a la enfermedad.

### Resum

Els enzims de la família de la PON (paraoxonasa) degraden peròxids lipídics, i això implica que aquests enzims podrien afectar de forma important una gran varietat de malalties en les que hi estiguin involucrades alteracions en el balanç redox i produir un augment de l'estrès oxidatiu. S'han descrit alteracions en els nivells circulants de PON1 en diverses malalties en les que l'estrès oxidatiu hi està involucrat. L'estudi intenta demostrar la modificació dels valors de PON en els diabètics i la conseqüència d'aquest canvi, tant a nivell de sèrum/plasma, on ja s'havien fet estudis al respecte, com a nivell de humor vitri, on no hi han estudis encara descrites. Es troben resultats amb significació estadística en els ulls amb edema macular diabètic (EMDBT), que, respecte els que no en tenen, presenten nivells augmentats en humor vitri de PON 1 i 3 i les seves activitats, i valors a la inversa en sèrum/plasma, la qual cosa recolza la hipòtesi que existeix una producció intraocular com a resposta a intentar frenar el grau d'inflamació associada a la malaltia.

### Abstract

Enzymes of the PON (paraoxonasa) family degrade lipid peroxides, and this means that what these enzymes could significantly affect a variety of diseases in which alterations involved in redox balance are increased oxidative stress. Alterations in the circulating levels of PON 1 have been described in various diseases, in which oxidative stress is involved. The study tries to demonstrate the modification of PON values in diabetic people and the consequence of this change, both at the serum/plasma levels, where studies had already been done about it, as a vitreous humor level, where studies have not been described yet. We found results with statistical significance in eyes with diabetic macular edema (EMDBT), which, with respect to those who have none, have increased levels in vitreous humor of PON1 and 3 and their activities, and values in reverse in serum/plasma. This fact support the hypothesis that there is an intraocular production in response to an attempt to halt the degree of inflammation associated with the disease.

Artículo premiado con una Beca en el 45º Congreso de la *Societat Catalana d'Oftalmologia*.

## Introducció

En 2015 havia 387 milions de persones en tot el món afectades de DM, de les que un 50% no estaven diagnosticades. La DM ha anat escalant posicions en el ranking mundial de causes de mortalitat. Se prevé un ràpid augment del nombre de casos nous en tot el món, fins a arribar a 592 milions de diabètics el 2035. Aquestes dades mostren la gravetat d'aquesta epidèmia global ja catalogada per l'Organització Mundial de la Salut (OMS). La conseqüència de l'augment de la diabetes, es reflecteix clarament en la càrrega que representa per als serveis de salut, i es considera que l'atenció d'aquesta malaltia i les seves complicacions consumeix un 9-14% dels pressupostos de salut de Europa i Estats Units<sup>1-3</sup>.

La DM és una malaltia complexa, ja que té un origen multifactorial i perquè afecta a moltes parts del organisme. La incapacitat del organisme per regular la glucèmia porta a un estat de hiperglucèmia mantinguda que provoca l'activació de diferents mecanismes bioquímics que succeeixen a nivell intracel·lular com conseqüència d'aquesta. Es activen la via del sorbitol, glicació proteica, protein quinasa, la hexosamina i, sobre tot, el estrés oxidatiu<sup>4</sup>.

Aquest estrés oxidatiu juga un paper fonamental en la patogènesis de malalties degeneratives cròniques, i es veu afavorit per la formació descontrolada de radicals lliures que poden procedir tant de fonts endògenes (del propi metabolisme cel·lular) o de fonts exògenes (llum ultravioleta, radiacions, pol·lució i/o tabac)<sup>4</sup>.

La retina és particularment susceptible al dany oxidatiu. Com a sistemes antioxidants primaris d'acció enzimàtica disposem del sistema oxidant-dismutasa (SOD), glutatión-peroxidasa (GPX), catalasa (CAT) i PON i com a antioxidants secundaris disposem dels antioxidants presents en els aliments com són els polifenols, vitamines i carotenos de entre d'altres<sup>4,5</sup>.

En concret la família de la PON<sup>6</sup> té un paper molt important en la lluita contra l'estrés oxidatiu. Està formada per 3 membres, coneguts com a PON 1, PON 2 i PON 3, els gens se situen localitzats de forma adyacente en el braç llarg del cromosoma 7<sup>7</sup>. Les proteïnes PON 1 i PON 3 se situen localitzades de forma intracel·lular i extracel·lular, estant unides a les lipoproteïnes de baixa densitat (HDL), mentre que PON2 només ha estat detectada intracel·lularment, unida a la membrana plasmàtica. PON 2 i PON 3 presenten només activitat lactonasa, mentre que

la proteïna PON1 presenta activitat paroxonasa (capacitat de hidròlisi de compostos organofosforats), activitat esterasa (capacitat per hidrolitzar èsters aromàtics) i lactonasa (capacitat per hidrolitzar lactones). En concret, la activitat lactonasa present en la 3, és la responsable de la hidròlisi de peròxids lipídics, els que estan implicats en el procés de aterogènesis i altres malalties caracteritzades per l'acumulació de greix. Per tant es pot determinar que tant PON 1 com PON 3 són elements importants de protecció contra el dany oxidatiu i la peroxidació lipídica<sup>4,5</sup>.

La retinopatia diabètica (RPDBT) es presenta en forma de microangiopatia inflamatori de baix grau per la combinació d'alteracions metabòliques que engloben hipoxia, glicosilació i estrés oxidatiu. Els mecanismes que inicien aquesta microangiopatia inflamatori de baix grau se desconocen, però segons els estudis, sembla que les lipoproteïnes de baixa densitat (LDL) oxidades tenen un paper important. Les LDL oxidades han demostrat ser citotòxiques per a les cèl·lules endotelials dels capil·lars de la retina i per a les pericèl·lules presents en la membrana basal. La baixa activitat de PON 1, juntament amb l'alta concentració de proteïna C reactiva (PCR) i, molt probablement el component inflamatori, estan associats a la disminució del potencial antioxidant en els pacients diabètics i són uns importants marcadors de la progressió de la retinopatia.

La PON1 actuaria a través de dos vies: la via metabòlica d'actuació antioxidant mitjançant la inhibició de la formació de MDA (producte de la peroxidació lipídica), produint un augment del MDA en la lipoproteïna de alta densitat (HDL) que porta a l'activació del receptor endotelial lecitina-like LDL (LOX-1) que induïx l'activació de la protein quinasa (PK), que a su vegada inhibeix la via de producció de l'òxid nítric. I la via d'actuació antiinflamatori se realitzaria a través de la inhibició de l'enzim mieloperoxidasa (MPO), aquesta molècula en condicions inflamatores uniria a la HDL i en la PON 1 formant grups ternaris, que inhibirien l'acció de la PON 1. La MPO és una proteïna derivada dels leucòcits que promou l'oxidació lipídica, unint-se a la PON 1, reduint la seva activitat a través de la modificació de alguns residus de tirosina i de metionina de la mateixa, lo que faria augmentar l'estrés oxidatiu<sup>4,6</sup> (Figura 1). Per tant la PON 1 seria una enzima clau en la prevenció dels mecanismes antioxidants i antiinflamatoris, tots dos relacionats amb la DM i les seves complicacions<sup>8-15</sup>.

Estudio de los valores de la paraoxonasa y su actividad en suero y humor vítreo de pacientes diabéticos

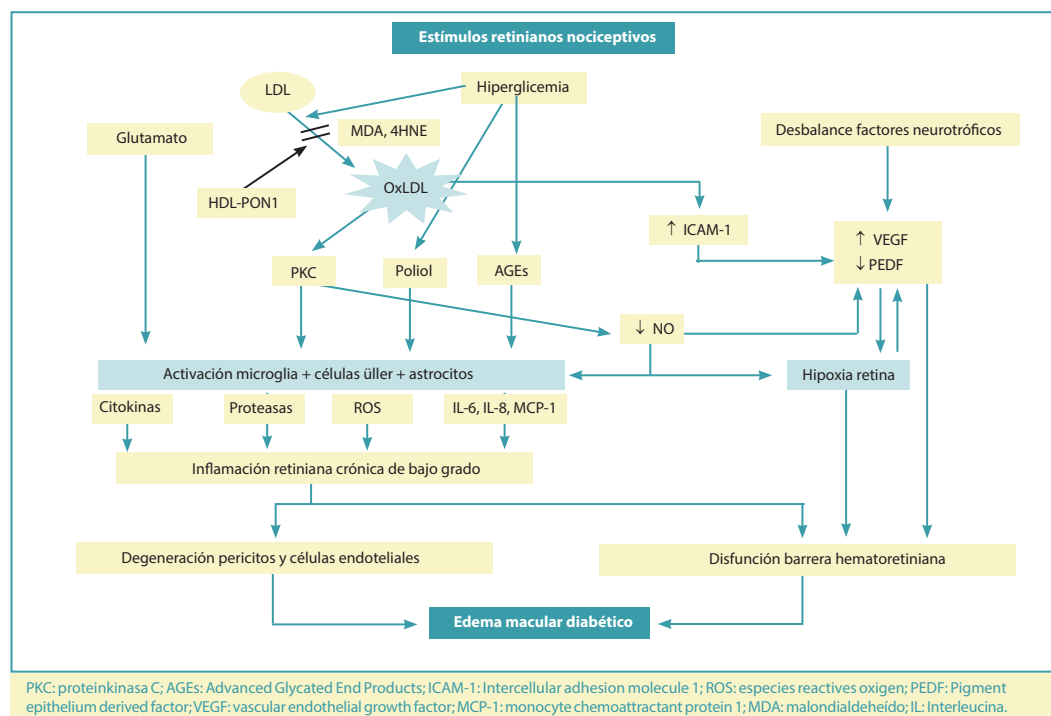


Figura 1. Esquema de la cascada inflamatoria desencadenada por la peroxidación lipídica de las LDL.

La PON 2 actuaría de forma intracelular, modulando el estrés oxidativo producido por los radicales libres generados por las mitocondrias, compuestos fundamentales en las vías que contribuyen a generar las enfermedades cardiovasculares. Los estudios publicados hasta la actualidad sugieren que la actividad antiaterogénica de la PON 2 estaría vinculada a la función mitocondrial<sup>16,17</sup>. Finalmente, la PON 3, comparte similitudes con la forma de actuación de la PON 2 a nivel mitocondrial, pero a su vez actuaría inhibiendo la oxidación de las LDL, protegiendo del desarrollo de la DM y de la aterosclerosis<sup>16,17</sup>, actuando sobre el desarrollo de la obesidad, hecho que se han demostrado en ratones.

La relación entre la PON y la DM ha despertado interés últimamente. En la DM se produce una sobreexpresión de las especies

reactivas oxidativas (ROS), consecuencia de la hiperglicemia crónica, la hiperinsulinemia y la dislipemia. Asimismo, los niveles de PON 1 se observan disminuidos, por la glicosilación de la enzima, estos bajos niveles se observan sobre todo en caso de existir complicaciones como son la neuropatía, nefropatía o RPDBT<sup>5</sup>. A su vez la existencia de algunos polimorfismos genéticos de la PON 1 y PON 2, se han asociado a la presencia de nefropatía y RPDBT. En el caso de la RPDBT se han descrito que el alelo L del polimorfismo Met/Leu55 de PON1 está asociado a una mayor presencia de complicaciones retinianas<sup>12,16</sup>.

El mecanismo que relacionaría las paraoxonasas y la DM sería a través de su acción sobre el estrés oxidativo. La sobre-expresión de PON1 disminuye en ratones el estrés oxidativo en macrófagos,

disminuyendo el riesgo de desarrollar DM. Los niveles bajos de PON 1 se han relacionado con aumento de la proteína C reactiva (PCR), que es independiente las adipocinas, y también con la obesidad o los lípidos<sup>12</sup>. A su vez un descenso de los niveles de PON1 aumentaría el nivel de inflamaciones de bajo grado, como las que se cree que acompañan a la RPDBT traccional y el EMDBT.

En la actualidad se desconoce bastante sobre la relación entre PON 1 y la RPDBT, todos los estudios realizados hasta ahora<sup>6,12,16</sup> se basan en datos analíticos a nivel de suero/plasma, no existiendo estudios de determinación a nivel de vítreo o retina de los valores de esta enzima.

Sin embargo, sí que se ha demostrado que a nivel del cristalino existen cantidades de mesurables de PON 1, así como a nivel del humor acuoso, datos publicados en un estudio realizado en enfermos intervenidos de catarata y con enfermedad pulmonar obstructiva crónica<sup>8,9</sup>.

En los estudios publicados hasta ahora se ha demostrado que la actividad PON1 está disminuida en diabéticos, ya que asocia un aumento de la peroxidación de lípidos que hay en la DM y, por tanto, contribuye a un factor determinante para la predisposición de las complicaciones de la misma.

Los estudios muestran niveles significativamente elevados de PCR en pacientes diabéticos con RPDBT en comparación con los pacientes diabéticos sin RPDBT, lo cual proporciona una correlación entre la inflamación y el desarrollo de las complicaciones microvasculares de la DM<sup>12,17</sup>.

## Material y métodos

Se seleccionaron aleatoriamente 63 ojos de pacientes derivados para cirugía vitreoretiniana, 32 (50,8%) eran diabéticos, de los cuales 5 era tipo 1 y 28 eran tipo 2, y 31 (49,2%) no diabéticos. La subpoblación diabética estaba formada por 3 (4,8%) ojos con RPDBT leve, 14 (22,2%) ojos con RPDBT moderada y 16 (25,4%) ojos con RPDNT proliferativa, y 20 (31,74%) de los ojos eran de pacientes que estaban tratados con insulina. Dentro de la población seleccionada los motivos para la intervención quirúrgica fueron en 11 (17,5%) casos extracción de membrana epirretiniana (MER), en 4 (6,3%) casos luxación del cristalino, en 8 casos (12,7%) vitrectomía por edema macular traccional, en 14 (22,3%) casos desprendimiento de retina, en 2 (3,2%) casos luxación de lente intraocular (LIO), en 18 (28,6%) casos hemovítreo y en 4 (6,3%) casos

agujero macular. Sólo 2 ojos (3,17%) habían recibido inyecciones intravítreas previas, y 15 (23,8%) ojos habían recibido tratamiento con láser argón previo.

Las variables de cantidad estudiadas fueron actividad paraxonasa en sérum (U/L), actividad lactonasa en sérum (U/L), concentración de PON 1 y 3 en sérum (mg/L), concentración de PON 1 y 3 en humor vítreo y sus actividades específicas (mg/dL) edad, índice de masa corporal (IMC), creatinina en sérum (mg/dL), urea en sérum (mg/dL), filtrado glomerular en sérum, glucosa en sérum (mg/dL), hemoglobina glicosilada en sérum (HbA1c), peso (Kg) y talla (cm).

Los objetivos principales eran demostrar la presencia de PON 1 a las muestras de humor vítreo, determinar los valores de PON en suero/plasma y humor vítreo en diabéticos y en pacientes diabéticos con EMDBT, determinar la relación entre la PON y el grado de RPDBT observada. Como objetivos secundarias relacionar niveles de PON en suero/plasma con los del humor vítreo, relacionar el control metabólico de la DM (a través de los valores de hemoglobina glicosilada [HbA1c]) con los niveles de PON en suero/plasma y humor vítreo y relacionar variables propias de la enfermedad diabética (tipo de DM, tratamiento, edad, hipertensión arterial [HTA], índice de masa corporal [IMC]) con PON en suero/plasma y humor vítreo. Los criterios de exclusión que se establecieron eran que los pacientes no hubieran tenido ninguna cirugía ocular en los 6 meses anteriores, la presencia de uveítis anterior o posterior activa o no en la actualidad, tratados con antiinflamatorios no esteroideos (AINE) y/o corticoides vía oral y/o vía tópica en los 6 meses anteriores y los tratados con anti factor de crecimiento endotelial (anti-VEGF) y/o corticoides por vía intravítrea en los 6 meses anteriores.

Se realizó una exploración oftalmológica completa con retinografía y tomografía de coherencia óptica (OCT) macular incluidas. La recogida y análisis de datos, con previa firma del consentimiento informado y la aprobación por parte del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario San Juan de Reus (CEIC), fue mediante extracción de muestras de suero y plasma-EDTA, que fueron centrifugadas y guardadas a -80°C hasta el momento de las determinaciones y muestras de humor vítreo intraocular extraídas vía vitrectomía pars plana enviadas directamente para realizar la inmunohistoquímica.

Las variables de cantidad estudiadas fueron: actividad paraxonasa en suero (U/L), actividad lactonasa en suero (U/L), concentración de PON 1 y 3 en suero (mg/L), concentración de PON 1 y 3 en humor vítreo y sus actividades específicas (mg/dl) edad, índice de

Estudio de los valores de la paraoxonasa y su actividad en suero y humor vítreo de pacientes diabéticos

masa corporal (IMC), creatinina en suero (mg/dl), urea en suero (mg/dl), filtrado glomerular en suero, glucosa en suero (mg/dl), HbA1c, peso (kg) y talla (cm).

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa estadístico SPSS. El grado de significación mínima se estableció en P 0,05 a cada test. Se utilizaron métodos estándar (Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilks) para comprobar si las variables seguían una distribución normal. Las diferencias entre dos grupos se analizaron con el test t-Student (paramétrico) o con el test U-Mann-Whitney (no paramétrico). Las diferencias que hay entre grupos se analizaron con el ANOVA. Para evaluar el grado de asociación entre dos variables se utilizaron los coeficientes de correlación de Pearson (paramétrico) y Spearman (no paramétrico) o el test de Kruskal Wallis (categórico).

## Resultados

No se encontraron diferencias dependientes del sexo, ni por edad, ni por presencia de HTA, ni por IMC.

El análisis estadístico entre ojos diabéticos y no diabéticos, excluyendo los casos de hemovítreo, no mostró resultados significativamente estadísticos, pero sí se obtuvo curiosamente un aumento

de las medias de los valores de PON1, PON3 y las actividades paraxonasa y lactonasa en el humor vítreo, y viceversa en suero/plasma (Tabla 1).

Donde se obtuvieron los resultados con más relevancia y con significación estadística fue al comparar los ojos con EMDBT y los ojos sin EMDBT, entendiéndose que los ojos de pacientes que no presentaban EMDBT engloban a pacientes diabéticos y a pacientes no diabéticos. PON 1 y 3, la actividad paraxonasa y lactonasa específicas en humor vítreo se hallaron aumentados, y los mismos valores disminuidos en sangre/suero (Tabla 2). El análisis estadístico al comparar los pacientes con EMDBT y sin EMDBT excluyendo los no diabéticos no daba resultados significativos.

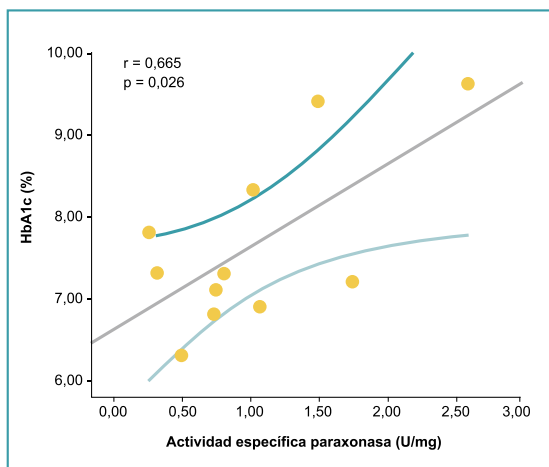
Según el grado de RPDBT se observó que la mayoría de datos significativos eran al comparar los casos de ojos sin RPDBT con los que tenían RPDBT proliferativa. Curiosamente los valores de las medias de PON 1 en humor vítreo aumentaron paralelamente al aumento del grado de RPDBT, menos en el estadio de RPDBT proliferativa, donde se producía un descenso (Tabla 3). Los ojos de los pacientes tratados con insulina comparados con los ojos de los paciente que no se trataban con insulina mostraba una disminución de los valores PON 1 y de la actividad paraxonasa en

	Diabético (N=32)	No diabético (N=31)	P
Actividad paraxonasa sérum (U/L)	138,40 (99,94-210,08)	135 (108,20-212,51)	0,48
Actividad lactonasa sérum (U/L)	6 (2,99-9,6)	6,15 (3,4-9,7)	0,89
Concentración PON 1 sérum (mg/L)	182,37 (4,90-550,02)	218,30 (37,28-631,72)	0,50
Concentración PON3 sérum (mg/L)	8,1 (6,03-20,63)	9,80 (5,54-17,16)	0,36
Concentración PON1 HV	0,24 (0,001- 1,12)	0,03 (0,0004-0,33)	0,67
Concentración PON3 HV	1,21 (0,09-58,3)	1,29 (0,17-12,80)	0,60
Edad paciente (años)	71,50 (42,30-81,00)	71 (48,20-83,80)	0,56
Creatinina sérum (mg/dL)	0,93 (0,33-2,90)	0,78 (0,55-1,44)	0,08
Urea sérum (mg/dL)	39,0 (22,8-135,16)	36,0 (18,7-55,7)	0,66
Filtrado glomerular sérum	44,00 (30,4-77,39)	64,5 (59-70)	0,18
Glucosa sérum (mg/dL)	144,00 (79,0-282,0)	91 (77,2-114,7)	0,00
HbA1c (%)	7,7	5,9 (5,9-5,9)	0,09
Peso (kg)	85,5 (62,45-105,0)	72,5 (51-96)	0,01
Talla (cm)	165 (150,3-182,2)	161,5 (143-175)	0,258
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	30,9 (25,5-39,48)	26,67 (21,45-40,35)	0,05
Actividad específica paraxonasa (U/mg)	0,80 (0,26-8,09)	0,62 (0,17-4,61)	0,27
Actividad específica lactonasa (U/mg)	0,03 (0,008-0,47)	0,27 (0,009-0,15)	0,39

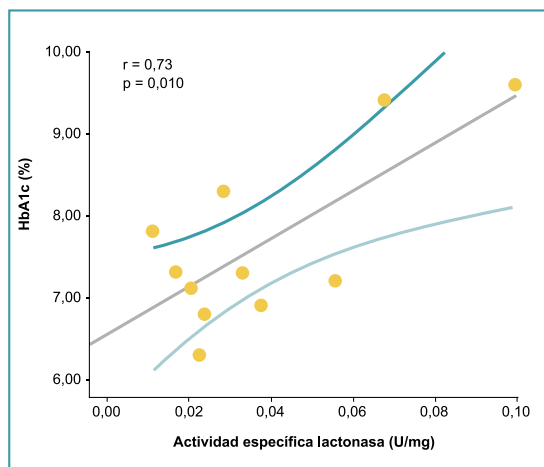
**Tabla 1.** Tabla descriptiva entre pacientes diabéticos y no diabéticos, excluyendo los casos con hemovítreo. Observamos marcados los valores de P con significación estadística de las variables cuantitativas.

Variabls quantitatives	EMDT (N = 8)	No EMDT (N = 55)	P
Actividad paroxonasa s3rum (U/L)	131,70 (119,90-163,60)	136,70 (108,20-214,68)	0,87
Actividad lactonasa s3rum (U/L)	6,00 (3,90-7,00)	6,15 (3,41-9,90)	0,58
Concentraci3n PON 1 s3rum (mg/L)	114,68 (63,14-588,03)	218,30 (10,55-423,82)	0,64
Concentraci3n PON3 s3rum (mg/L)	8,00 (6,10-21,80)	9,2 (5,7-15,98)	0,75
Concentraci3n PON1 HV	0,15 (0,02-1,33)	0,02 (0,001-0,28)	<b>0,02</b>
Concentraci3n PON3 HV	3,47 (0,78-19,67)	1,18 (0,18-12,29)	<b>0,01</b>
Edad paciente (a3os)	69,50 (49,00-79,00)	72 (43,80-81,4)	0,40
Creatinina s3rum (ml/min o mg/dL)	0,89 (0,40-1,25)	0,81 (0,55-2,44)	0,95
Urea s3rum (mg/dL)	39,50 (31,00-55,00)	37,00 (22,15-74,8)	0,77
Filtrado glomerular (mg/dL)	---	45,00 (30,4-77,39)	---
Glucosa en s3rum (mg/dL)	129,00 (110,00-223,00)	102,00 (79,0-260,40)	0,06
HbA1c (%)	7,75 (7,2-9,40)	7,30 (5,9-13,50)	0,53
IMC	29,75 (26,77-35,88)	30,11 (5,9-13,50)	0,85
Actividad espec3fica paroxonasa (U/mg)	1,18 (0,26-2,01)	0,65 (0,26-5,34)	<b>0,53</b>
Actividad espec3fica lactonasa (U/mg)	0,05 (0,01-0,11)	0,02 (0,008-0,21)	<b>0,40</b>

**Tabla 2.** Tabla descriptiva entre pacientes con EMDT y sin EMDT. Observamos marcados los valores de P con significaci3n estadística de las variables cuantitativas.



**Figura 2.** Gráfica de correlaci3n positiva entre HbA1c y la actividad espec3fica paroxonasa en los pacientes diab3ticos.



**Figura 3.** Gráfica de correlaci3n positiva entre HbA1c y la actividad espec3fica lactonasa en los pacientes diab3ticos.

s3rum/plasma y aumento de la actividad paroxonasa y lactonasa en humor vitreo (Tabla 4). Las gráficas de correlaci3n tambi3n mostraron resultados estadísticamente significativos en la poblaci3n

diab3tica, donde se encontr3 una  $r = 0,665$  entre los valores de HbA1c y la actividad espec3fica paroxonasa, y una  $r = 0,73$  entre los valores la HbA1c y la actividad espec3fica lactonasa (Figuras 2 y 3).

Estudio de los valores de la paraoxonasa y su actividad en suero y humor vítreo de pacientes diabéticos

Variables cuantitativas	No RPDBT (N = 30)	RPDBT leve (N = 3)	RPDBT mod. (N = 14)	RPDBT prolif. (N = 16)	P1	P2	P3	P4	P5	P6
Actividad paraxonasa sérum (U/L)	135 (108,20-212,51)	177,00 (155,20-215,60)	138,40 (116,60-197,20)	131,70 (96,40-183,70)	<b>0,05</b>	0,53	0,80	0,12	<b>0,03</b>	0,43
Actividad lactonasa sérum (U/L)	6,1 (3,43-9,70)	5,7 (5,60-7,80)	6,20 (3,90-7,00)	5,80 (2,60-10,40)	0,70	0,79	0,95	0,76	0,76	0,94
Concentración PON 1 sérum (mg/L)	218,3 (37,2-631,72)	281,21 (241,68-356,18)	176,26 (63,14-588,03)	153,30 (2,73-342,36)	0,19	0,83	0,13	0,57	<b>0,02</b>	0,19
Concentración PON 3 sérum (mg/L)	9,8 (5,54-17,16)	7,30 (7,20-16,00)	8,10 (7,10-21,80)	8,40 (6,00-10,30)	0,84	0,94	0,15	0,55	0,88	0,51
Concentración PON 1 HV	0,03 (0,0004-0,33)	0,02 (0,01-0,05)	0,04 (0,01-1,33)	0,01 (0,001-0,29)	0,71	0,43	<b>0,03</b>	0,48	0,55	<b>&lt;0,01</b>
Concentración PON 3 HV	1,42 (0,17-13,05)	0,98 (0,56-3,62)	1,30 (0,00-19,67)	1,18 (0,23-84,09)	0,94	0,65	<b>0,03</b>	<b>0,02</b>	0,85	0,64
Edad paciente	71,5 (47,85-83,90)	74,00 (67,00-81,00)	71,00 (49,00-79,00)	70,50 (41,00-81,00)	0,57	0,51	0,31	0,43	0,25	0,72
Creatinina sérum (ml/min o mg/dL)	0,78 (0,55-1,44)	1,09 (1,09-1,09)	0,93 (0,40-1,76)	0,91 (0,29-3,10)	0,40	0,13	0,23	0,83	0,87	0,95
Urea sérum (mg/dL)	36,00 (18,70-55,70)	36,00 (36,00-36,00)	46,00 (26,00-71,00)	35,00 (22,00-150,20)	0,90	0,19	0,75	0,80	0,90	0,41
Filtrado Glomerular (mg/dL)	64,5 (59,00-70)	---	44,00 (44,00-46,00)	38,30 (30,40-77,39)	---	0,20	0,80	---	---	0,70
Glucosa en sérum (mg/dL)	90,5 (77,00-114,00)	101,00 (101,00-101,00)	126,00 (79,00-176,00)	166,50 (92,00-282,00)	0,48	<b>0,001</b>	<b>0,000</b>	0,46	0,23	<b>0,02</b>
HbA1c (%)	5,9 (5,90-5,90)	6,80 (6,80-6,80)	7,50 (6,12-8,30)	9,00 (6,30-13,50)	0,31	0,22	<b>&lt;0,01</b>	0,44	<b>0,02</b>	0,31
IMC	26,67 (21,45-40,35)	29,04 (27,60-30,48)	32,52 (25,05-36,51)	31,16 (24,52-39,64)	0,64	0,06	<b>0,03</b>	0,53	0,44	0,97
Actividad específica paraxonasa (U/mg)	0,62 (0,17-4,61)	0,60 (0,55-0,73)	0,84 (0,26-2,01)	1,06 (0,28-45,79)	0,71	<b>0,05</b>	<b>0,05</b>	0,57	0,29	0,25
Actividad específica lactonasa (U/mg)	0,02 (0,009-0,15)	0,02 (0,01-0,02)	0,03 (0,01-0,10)	0,04 (0,007-2,12)	0,35	0,63	<b>0,04</b>	0,69	0,12	0,17

P1: No RPDBT- RPDBT leve, P2: No RPDBT- RPDBT moderada, P3: No RPDBT- RPDBT proliferativa, P4: RPDBT leve - RPDBT moderada, P5: RPDBT leve- RPDBT proliferativa, P6: RPDBT moderada - RPDBT proliferativa.

Taula 3. Tabla descriptiva entre los distintos grados de RPDBT.

## Discusión

Existieron varias limitaciones en el estudio, la principal fue el número de ojos incluidos en el estudio, sobretudo al intentar comparar la subpoblación diabética y la no diabética, y aun más agravado al intentar excluir los casos de hemovítreo en algunas comparaciones estadísticas, que ya no fueron posibles por el número insuficiente de casos, y el programa estadístico no lo permitía. La

otra limitación fue que, se aceptó previamente con el CEIC del Hospital el no intervenir quirúrgicamente para la obtención de muestra de humor vítreo a los ojos que no hubiera una indicación quirúrgica para hacerlo, de este modo no podemos obtener muestras suficientes de diabéticos que no precisan cirugía.

Hay que tener en cuenta que los valores de PON y de otros componentes de la cascada inflamatoria pueden estar influenciados por

Variabls quantitatives	Si TT con insulina (N=20)	No TT con insulina (N=43)	P
Actividad paroxonasa sérum (U/L)	128,5 (96,4-183,7)	156,9 (123,3-215,6)	<b>0,03</b>
Actividad lactonasa sérum (U/L)	6,0 (2,6-10,4)	6,0 (3,9-7,8)	1,0
Concentraci3n PON 1 sérum (mg/L)	160,29 (2,7-375,34)	261,4 (63,14-588,03)	<b>0,01</b>
Concentraci3n PON3 Sérum (mg/L)	8,2 (6,0-12,9)	8,0 (7,1-21,80)	0,84
Concentraci3n PON1 HV	0,02 (0,001-1,33)	0,04 (0,01-0,21)	0,27
Concentraci3n PON3 HV	1,31 (0,23-84,09)	0,87 (0,00-7,07)	0,17
Edad paciente	70,5 (41,1-80,9)	71,0 (49,0-81,0)	0,25
Creatinina sérum (ml/min o mg/dL)	0,95 (0,30-3,07)	0,86 (0,4-1,47)	0,57
Urea sérum (mg/dL)	37,0 (22,0-150,2)	46,0 (31,0-64,0)	0,58
Filtrado Glomerular (mg/dL)	44,0 (30,4-77,39)	46,0 (46,0-46,0)	0,66
Glucosa en sérum (mg/dL)	151,0 (79,0-282,0)	127,0 (101,0-176,0)	0,31
HbA1c (%)	7,7 (6,3-13,5)	7,45 (6,1-8,3)	0,28
IMC	31,93 (24,52-39,64)	30,11 (25,05-36,26)	0,48
Actividad específica paroxonasa (U/mg)	0,99 (0,28-45,79)	0,66 (0,266-2,01)	<b>0,02</b>
Actividad específica lactonasa (U/mg)	0,04 (0,007-2,12)	0,02 (0,01-0,1)	<b>0,01</b>

**Taula 4.** Tabla descriptiva entre pacientes con tratamiento con insulina y sin tratamiento con insulina.

variables interpersonales de cada paciente, como por ejemplo en los casos de enfermedad hepática, donde pueden existir valores inferiores de PON ya que ésta se sintetiza principalmente en el hígado.

Teniendo en cuenta que no hay referencias de otros estudios similares y las limitaciones del estudio, nos cuesta extraer conclusiones firmes sobre los resultados obtenidos.

## Conclusi3n

Parte del grupo de investigaci3n donde se realizo el estudio ya haba publicado resultados sobre la PON en otras enfermedades, en concreto en las hepatopatías cr3nicas, donde se observó que la disminuci3n significativa de la actividad de PON 1 en enfermedades hepáticas cr3nicas está relacionada con el grado de disfunci3n hepática y no con diferencias alélicas o genóticas<sup>18</sup>. El mismo grupo de investigaci3n estudió las relaciones entre la PON1 y las alteraciones endoteliales corneales en los pacientes con enfermedad pulmonar cr3nica (EPOC), éstos últimos mostraron una disminuci3n significativa de la actividad de PON1 en suero y una disminuci3n significativa en la densidad de células endoteliales corneales<sup>9</sup>. Asimismo Fang *et al.*<sup>19</sup> mediante estudios genéticos,

analizaron los polimorfismos que afectan la actividad de la PON 1 y observaron que aquellos fenotipos que mostraban una actividad alta presentaban un menor riesgo de desarrollar cáncer<sup>19</sup>.

Nuestro estudio mostró una disminuci3n de PON1 a nivel de suero/plasma en diabéticos, aunque no obtuvo resultados con significaci3n estadística, pero si hay otros estudios del grupo Karabina *et al.*<sup>10</sup> que habían obtenido resultados que sugerían que la protecci3n de la actividad esterolítica de PON1 por antioxidantes era importante para preservar su acci3n sobre los peróxidos de fosfolípidos, dicho de otra manera, que un incremento del estrés oxidativo en diabéticos conllevaba a una pérdida en la actividad PON 1, además la disminuci3n en la actividad de PON1 estaba inversamente relacionada con los niveles de LDL oxidadas en el sérum/plasma de estos pacientes.

Los hallazgos mas significativos fueron, por un lado, una correlaci3n positiva con significaci3n estadística entre los grados de actividad paroxonasa y lactonasa en humor vítreo y el valor de HbA1c de los ojos diabéticos. Creemos que fue un hallazgo importante teniendo en cuenta que la HbA1c es uno de los marcadores del estado diabético del enfermo a medio/largo plazo, se visualizó

claramente siguiendo las líneas de tendencia de las gráficas de correlación. Y por otro lado el aumento de producción de PON 1 y 3, y sus actividades a nivel de humor vítreo en los casos que asociaban un cierto grado de inflamación, como en los casos de EMDBT, y viceversa en suero/plasma, ya que la etiología del EMDBT reside en el inicio de un estadio inflamatorio que va a desencadenar una serie de complicaciones. El grupo que no mostraba EMDBT también englobaba pacientes diabéticos, resultado que nos hace pensar en que este aumento estadísticamente significativo de PON 1 y 3 en humor vítreo se halla más gravemente afectado en los casos que asocian complicaciones inflamatorias, lo que nos justificaría que no saliesen resultados con significación estadística al comparar los que presentaban EMDBT y los que no en la subpoblación diabética. No se conoce exactamente el mecanismo que la producía, pero este resultado refuerza la hipótesis sobre una producción intraocular como respuesta a un estado inflamatorio de bajo grado en los estadios iniciales de la RPDBT. La publicación de Sarabina *et al.*<sup>11</sup> trata de conocer la distribución tisular de quimiocinas, PON y mediadores de la inflamación en las situaciones que engloban acciones antioxidantes y antiinflamatorias, utilizando inmunohistoquímica y PCR cuantitativa en tiempo real se investigó PON 1 y mensajero en 23 tejidos de ratones, obteniendo una presencia de PON 1, 2 y 3, y quimiocinas en la mayoría de los tejidos investigados y, sorprendentemente el ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de estas proteínas también se expresó en la mayor parte de estos tejidos sugiriendo una producción local y la capacidad de responder *in situ* a los estímulos inflamatorios. Además, la amplia distribución y expresión del ARNm para PON y citoquinas sugerían un papel sistémico, probablemente coordinado, en la respuesta inflamatoria global.

Encontramos tendencia a un aumento paralelo entre del grado de RPDBT y los valores de PON 1 y 3 en humor vítreo, hasta llegar al estadio de RPDBT proliferativa donde estos valores sufrieron una disminución. Creemos que este hallazgo puede tener relación con una incapacidad de la PON para poder modular su producción y poder hacer frente a los estadios de inflamación más avanzados. Esta hipótesis se vería apoyada por el hecho que se demuestro una presencia intraocular de PON en humor vítreo, un vínculo entre la concentración de PON 1 y 3, la inflamación y el desarrollo de complicaciones microvasculares en DM, sugerido todo ello por los resultados obtenidos. Sobre las diferencias de evaluación de la PON entre diabéticos con RPDBT y sin RPDBT habla el estudio de Nowak *et al.*<sup>12</sup> cuyos resultados se basan en

comparar pacientes diabéticos sin RPDBT y pacientes diabéticos con RPDBT, obteniendo valores significativamente elevados de *high-sensitivity C-reactive protein* (hs-CRP) y inferiores de PON 1 en sérum/ plasma en los pacientes diabéticos con RPDBT, que confirmaría que el estrés oxidativo podría desempeñar un papel en la patogénesis de la RPDBT. Debido a la diferencia significativa en la relación PON 1/PCR entre los pacientes diabéticos con y sin RPDBT, parece que ésta relación PON 1/PCR puede utilizarse como un marcador bioquímico para la progresión de la RPDBT, aunque, evidentemente, se precisaría de más estudios al respecto.

Otros estudios<sup>14</sup> hablan sobre la influencia de PON 1 sobre las alteraciones metabólicas inducidas por las LDL oxidadas. Los resultados sugieren que PON 1 puede desempeñar un papel significativo en la supervivencia de células endoteliales mediante la protección de las mismas de las alteraciones de la cadena inducida por las LDL oxidadas, ya que existe un papel protector de HDL y PON 1 contra la oxidación y la apoptosis en las células endoteliales. Así pues las HDL de ratones deficientes de PON 1 tenían una capacidad deteriorada para proteger las células endoteliales de las LDL oxidadas. Nuestro estudio no obtuvo resultados relevantes en este sentido ya que se encontró un aumento de actividad paraoxonasa en sérum/plasma y valores de PON 1 en humor vítreo disminuidos en los ojos de pacientes dislipémicos, comparados con los no dislipémicos.

Y por último, destacar los resultados que se obtuvieron al comparar los ojos de pacientes tratados con insulina con los de los ojos de pacientes no tratados con insulina, pudiendo ser o no ser diabéticos éstos últimos. Teniendo en cuenta que el hígado es uno de los principales órganos donde existe producción de PON<sup>11</sup>, y que al realizar la comparación, el grupo de tratados con insulina sólo englobaba a diabéticos, y el grupo de no tratados con insulina englobaba a algunos diabéticos y no diabéticos, podemos interpretar estos resultados como una posible consecuencia del mayor riesgo de enfermedades del hígado que tienen los diabéticos en comparación con otro grupo que engloba pacientes diabéticos no tratados con insulina y pacientes no diabéticos, así pues los diabéticos padecerían una dificultad en la producción de PON en suero/plasma debido a su peor estado hepático. En éste sentido se han realizado estudios<sup>13</sup> donde se evaluaron los efectos de la metformina en el hígado de ratones deficientes de PON1 que, sin tratar, presentaban un grado leve de esteatosis hepática. La administración de metformina agravó la inflamación

en los animales que recibieron un alimento estándar para ratones en comparación con aquellos alimentados con una dieta rica en grasas, así pues, podemos deducir que la administración de metformina produce efectos indeseables en el hígado de los ratones deficientes de PON 1.

### Agradecimientos

A todo el personal del servicio de Oftalmología del Hospital Sant Joan de Reus, en especial al Dr. Marc Baget y Dr. Ángel Bautista. A todo el personal del Instituto Pere Virgili de Reus, en especial a la Dra. Anabel Heredia. Y finalmente a la enfermera Eulàlia Oriol por su habilidad en extracciones de sangre en diabéticos.

### Bibliografía

1. Organización Mundial de la Salud. Informe mundial sobre la diabetes. Disponible en: [www.who.int/diabetes/global-report](http://www.who.int/diabetes/global-report). Acceso 30 de noviembre 2016.
2. Mathers CD, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med.* 2006;3(11):e442.
3. Organización Mundial de la Salud. Plan de acción mundial para la prevención y control de las enfermedades no transmisibles 2013-2020. Disponible en: [http://www.who.int/cardiovascular\\_diseases/15032013\\_updated\\_revised\\_draft\\_action\\_plan\\_spanish.pdf](http://www.who.int/cardiovascular_diseases/15032013_updated_revised_draft_action_plan_spanish.pdf). Acceso 30 de noviembre 2016
4. Elizalde J, López MI. *Retinopatía Diabética y otras complicaciones oculares de la diabetes mellitus*. Barcelona: Trespuntzero; 2007.
5. Hofer SE, Bennetts B, Chan AK, et al. Association between PON 1 polymorphisms, PON activity and diabetes complications. *J Diabetes Complications.* 2006;20:322-8.
6. Tang J, Kern TS. Inflammation in diabetic retinopathy. *Prog Retin Eye Res.* 2011;30(5):343-58.
7. Mackness M, Mackness B. Human paraoxonase-1 (PON1): Gene structure and expression, promiscuous activities and multiple physiological roles. *Gene.* 2015;567(1):12-21.
8. Soler N, Romero-Aroca P, Gris O, et al. Corneal endothelial changes in patients with chronic obstructive pulmonary disease and corneal vulnerability to cataract surgery. *J Cataract Refract Surg.* 2015;41:313-9.
9. Soler N, Garcia-Heredia A, Marsillach J, et al. Paraoxonase-1 is associated with corneal endothelial cell alterations in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Inv Ophthalmol Vis Sci.* 2013;54(8):5852-8.
10. Karabina SA, Lehner AN, Frank E, et al. Oxidative inactivation of paraoxonase-implications in diabetes mellitus and atherosclerosis. *Biochim Biophys Acta.* 2005; 1725(2): 213-21.
11. Rodríguez-Sanabria F, Rull A, Beltrán-Debón R, et al. Tissue distribution and expression of paraoxonases and chemokines in mouse: the ubiquitous and joint localisation suggest a systemic and coordinated role. *Journal of Molecular Histology.* 2010;41(6):379-86.
12. Nowak M, Wielkoszyński T, Marek Kos-Kudła B, et al. Antioxidant potential, paraoxonase 1, ceruloplasmin activity and C-reactive protein concentration in diabetic retinopathy. *Clin Exp Med.* 2010;10(3):185-92.
13. García-Heredia A, Riera-Borrull M, Fort-Gallifa I, et al. Metformin administration induces hepatotoxic effects in paraoxonase-1-deficient mice. *Chem Biol Interact.* 2016;249:56-63.
14. García-Heredia A, Marsillach J, Rull A, et al. Paraoxonase-1 inhibits oxidized low-density lipoprotein-induced metabolic alterations and apoptosis in endothelial cells: a non directed metabolomic study. *Mediators Inflamm.* 2013;2013:156053.
15. García-Heredia A, Kensicki E, Mohny RP, et al. Paraoxonase-1 deficiency is associated with severe liver steatosis in mice fed a high-fat high-cholesterol diet: a metabolomic approach. *J Proteome Res.* 2013;12(4):1946-55.
16. She ZG, Chen HZ, Yan Y, et al. The human paraoxonase gene cluster as a target in the treatment of atherosclerosis. *Antioxid Redox Signal.* 2012;16(6):597-632.
17. Devarajan A, Shih D, Reddy ST. Inflammation, infection, cancer and all that... the role of paraoxonases. *Adv Exp Med Biol.* 2014; 824:33-41.
18. Ferré N, Camp J, Prats E, et al. Serum Paraoxonase activity: a new additional test for the improved evaluation of chronic liver damage. *Clinical Chemistry.* 2002;48(2):261-8.
19. Fang D, Fan C, Ji Q, et al. Differential effects of paraoxonase 1 (PON1) polymorphisms on cancer risk: evidence from 25 published studies. *Mol Biol Rep.* 2012;39:6801-9.







Comitè d'Ètica d'Investigació Clínica



## INFORME DEL COMITÈ DE ÈTICA DE INVESTIGACIÓ CLÍNICA

Don Josep M<sup>a</sup> Alegret Colomé , Secretario del COMITÈ DE ÈTICA DE INVESTIGACIÓ CLÍNICA DEL HOSPITAL UNIVERSITARI SANT JOAN DE REUS.

### HACE CONSTAR QUE:

Que en la reunió de fecha 27 de Febrero de 2014, acta 02/2014, se ha evaluado el proyecto de Investigación titulado "Relació de la paraxonasa PON1 amb l'estrès oxidatiu en l'afectació microvascular en retinopatia diabètica", a instancias de la Investigadora Dra. Patricia Pujol Gomis del Hospital Universitari Sant Joan de Reus servicio de Oftalmología.

De acuerdo con las normas de funcionamiento interno del CEIC y las especificaciones de las diferentes convocatorias de financiación para proyectos de investigación con fondos públicos y privados, se decide pronunciarse **Favorablemente** respecto al proyecto anteriormente reseñado.

Dicha aprobación tiene lugar después de asegurarse que se cumplen los requisitos éticos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y que la capacidad del investigador y los medios disponibles son los apropiados. Se recuerda al investigador principal, la necesidad de informar al CEIC sobre la marcha del proyecto y que al finalizar el mismo serán inspeccionados los consentimientos informados firmados por los sujetos incluidos en el estudio.

La composición actual del CEIC del Hospital Universitari Sant Joan de Reus es la siguiente:

#### Presidente

Dr. Jorge Joven Mariel  
Director del Centre de Recerca Biomèdica de Reus. Representant de la Comissió d'Investigació.

#### Secretario

Dr. Josep M<sup>a</sup> Alegret Colomé  
Cardiólogo. Servicio de Medicina Interna del Hospital Universitario Sant Joan de Reus.

#### Vocals

Dr. Joan Fernández Ballart  
Catedrático de Medicina Preventiva i Salut Pública. Facultat de Medicina i Ciències de la Salut. Universitat Rovira i Virgili.

Dra. Elisabet Vilella Cuadrada  
Departament de Formació i Investigació de l'Hospital Psiquiàtric Universitari Institut Pere Mata. Representant de la Comissió d'Investigació.

Dr. Jordi Mallol Mirón  
Catedrático de Farmacología, Facultat de Medicina, Universitat Rovira i Virgili.

Sra. Mercè Vilella Papaseit  
Representant de la Societat Civil.

Dr. Francesc Xavier Sureda Batlle  
Professor Titular de Farmacología. Universitat Rovira i Virgili.

C/ Josep Laporte s/n - Zona Docencia - Aula 6 - 43204 - REUS  
Tel. Directe: 977 30 85 51  
Tel. HUSJR: 977 31 03 00 - Ext. 5547  
ceic@grupsgagessa.com



Comitè d'Ètica d'Investigació Clínica



DE: DR. JOSEP M<sup>a</sup> ALEGRET COLOMÉ

- SECRETARI DEL CEIC

A: DRA. PATRÍCIA PUJOL GOMIS

- OFTALMOLOGIA

**Assumpte:** projecte PON-RET

**Ref. aprovació CEIC :** 14-02-27/2proj2

Benvolguda Dra. Pujol ,

Et comunico que amb data 27 de febrer de 2014, el CEIC ha avaluat el projecte d'investigació titulat "**Relació de la paraxonasa PON1 amb l'estrès oxidatiu en l'afectació microvascular en retinopatia diabètica**", del qual ets investigadora principal.

El CEIC ha considerat el projecte **favorable**.

Cordialment,

Dr. Josep M<sup>a</sup> Alegret Colomé  
Secretari Comitè d'Ètica d'Investigació Clínica  
Hospital Universitari Sant Joan de Reus

Reus, 27 de febrer de 2014



Comitè d'Ètica d'Investigació Clínica



**Sra. Maria José Rojas Cecilia**  
Diplomada Universitària d'Infermeria. Servei de Medicina Interna de l'Hospital Universitari Sant Joan.

**Sr. Pere López Bruno.**  
Director de Comunicació i Relacions Externes Grup Sagessa.

**Sra. M<sup>a</sup> Mar Granell Barceló**  
Advocada i Assessora Jurídica del Comitè.

**Sra. M<sup>a</sup> Francisca Jiménez Herrera**  
Professora d'Ètica i Legislació en la "Universitat Rovira i Virgili" Departament d'Infermeria. Màster en Bioètica i Dret.

**Dra. Montserrat Boj Borbones**  
Servei de Farmàcia de l'Hospital Universitari Sant Joan.

**Dra. Isabel Rosich Martí**  
Farmacèutica Atenció Primària

**Dr. Joaquín Escribano Súbias**  
Metge del Servei de Pediatria. Representant de la Comissió de Bioètica Assistencial. Membre de la Comissió d'Investigació.

**Dra. Núria Plana Gil**  
Metge Adjunt del Servei de Medicina Interna de l'Hospital Universitari Sant Joan de Reus. Pediatria.

**Dra. Anna Lafuerza Torres**  
Metge Adjunt Radioteràpia. Representant de la Comissió de Bioètica Assistencial.

**Sr. Josep M<sup>a</sup> Trabalón Domínguez**  
Representant de la Societat Civil.

Firma

Dr. Josep M<sup>a</sup> Alegret Colomé  
Secretario CEIC

Reus, 27 de Febrero de 2014  
Ref. CEIC : 14-02-27/2proj2

C/ Josep Laporte s/n - Zona Docencia - Aula 6 - 43204 - REUS  
Tel. Directe: 977 30 85 51  
Tel. HUSJR: 977 31 03 00 - Ext. 5547  
ceic@grupsgassa.com







UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
RELACIÓ DE LA PARAOXONASA PON1 AMB L'ESTRÈS OXIDATIU EN L'AFECTACIÓ MICROVASCULAR  
EN RETINOPATIA DIABÈTICA  
Patricia Pujol Gomis



UNIVERSITAT  
ROVIRA i VIRGILI