

**Universidad Cardenal Herrera CEU**  
**Departamento de Medicina y Cirugía Animal**



**Efectos de la radiación ultravioleta  
sobre la transmisión espectral del  
cristalino del cerdo común**

**TESIS DOCTORAL**

Presentada por:  
**Cristina Artigas Felipe**

Dirigida por:  
**Dr. José María Artigas Verde**  
**Dra. Amparo Navea Tejerina**  
**Dra. María del Mar López Murcia**

**Valencia**  
**Enero 2015**



A mis padres y hermano, que son mi apoyo,  
A Manu que es mi equilibrio,  
A Martina que es mi alegría.



# Agradecimientos

En este trayecto de penas y glorias que es materializar una tesis doctoral, hay muchas personas a las que estar agradecida. Bien sea por su labor y esfuerzo, o bien por su apoyo y distracción que logran equilibrarte en los momentos difíciles.

Primero y más importante es agradecer a **mis directores** la oportunidad, los medios y el trabajo realizado para llevar a cabo y llevar a buen puerto esta investigación. Sin vosotros esto nunca habría sido posible. Habéis sido los directores que toda doctoranda le gustaría tener. Gracias por ofrecerme vuestro tiempo, sabiduría, medios y ánimo en todos los pasos de esta tesis.

María, tu has compartido en especial los últimos momentos de estrés y sprint final, muchas gracias por tu apoyo y por sacar tiempo donde parecía imposible que lo hubiese.

Gracias al equipo de la FOM, en especial a Leticia por su impecable trabajo en el laboratorio.

La portada original de esta tesis es obra de Pau García, y no tengo palabras, años, ni botellas de vino para agradecerte todo lo que has hecho por mí. Siempre con una sonrisa, dulce, amable y comprensivo (y eso sólo en el trabajo).

En el lado de la distracción y terrazas perdidas, quiero agradecer por un lado a mis amigas de siempre, Patricia, Amparo, Cris y Elena. Vosotras siempre estáis cerquita, y vuestros años de amistad y apoyo fueron, son y serán siempre lo que me mantiene cuerda y de pie. Gracias por estar ahí y compartir gran parte de mi vida. Por otro lado, tengo que agradecer a un grupo de terracistas su amistad y su cariño estos últimos años. Vosotros sabéis quienes sois, Amparos. En especial, a mi cuñadísimo Guille, por su buen humor que siempre me levanta el ánimo, a Guille, Pablo y Tote por su cariño que no decae nunca, a Belén por su PNLrismo y buen rollo, a Jordi y Esther por su complicidad y dulzura.

También quiero recordar a mis amigos Inma y Jose, Inma me acompañó en buenos y menos buenos momentos de los años de la tesina, y eso forjó una amistad que espero que dure muchos años más, ambos os merecéis lo mejor que está por venir.

He de agradecer a mis padres sin los cuales esta tesis no hubiese sido posible. A mi padre el haberme brindado esta oportunidad y haber sido tan constante y tenaz cuando yo

no sabía por dónde ir. Y a mi madre por su apoyo y amor que no tiene límite, a ambos os debo lo que soy.

A Javier y Maysa tengo que agradecer el haberme tratado como una hija desde el primer día, si acaso mejor.

Por último y más importante, el que me conoce mejor que yo misma, el que sabe equilibrarme y enriquecerme, el que ha conseguido la mejor versión de mí, el que siempre está y nunca desfallece. Manu, nunca hubiese sido capaz de conseguir todo lo que he construido estos últimos años sin ti, tu amor y apoyo incondicional lo ha hecho posible: la clínica, la tesis, y nuestro mayor logro hasta la fecha: Martina. Ambos, junto con Barnie, sois mi familia, mi motivación para ser mejor, mi alegría, mi razón de ser, mi amor. Y este camino no ha hecho más que comenzar.

# ÍNDICE

	<b>Página</b>
Índice de abreviaturas	10
Índice de figuras	12
Índice de tablas	18
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>19</b>
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>25</b>
<b>3. INTRODUCCIÓN TEÓRICA.</b>	<b>29</b>
<b>3.1. La radiación ultravioleta</b>	<b>31</b>
<b>3.1.1. Efectos oculares de la radiación UV</b>	<b>35</b>
<b>3.1.2. Estudios sobre los efectos de la radiación UV en el cristalino de diferentes especies de mamíferos</b>	<b>37</b>
<b>3.1.2.1. Conejo</b>	<b>37</b>
<b>3.1.2.2. Cobaya</b>	<b>40</b>
<b>3.1.2.3. Rata</b>	<b>41</b>
<b>3.1.3. Estudios sobre los efectos de la radiación UV en el cristalino de cerdo</b>	<b>42</b>
<b>3.1.4. Efectos de la radiación UV sobre el cristalino humano. Conocimientos actuales</b>	<b>46</b>
<b>3.2. Anatomía y fisiología del cristalino</b>	<b>49</b>
<b>3.2.1. Anatomía macroscópica y microscópica</b>	<b>49</b>
<b>3.2.2. Composición química del cristalino</b>	<b>51</b>
<b>3.2.3. Fotometría ocular.</b>	<b>53</b>
<b>3.2.4. Propiedades ópticas del cristalino de cerdo.</b>	<b>54</b>
<b>3.3. Mecanismos implicados en la formación de cataratas</b>	<b>57</b>
<b>3.4. Regeneración del cristalino.</b>	<b>60</b>
<b>3.5. El ojo porcino como modelo animal.</b>	<b>61</b>

3.5.1. Patologías del cristalino descritas en cerdos in vivo	62
3.6. Referencias de introducción e introducción teórica	63
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS.</b>	<b>71</b>
4.1. Diseño experimental	73
4.2. Obtención y extracción de los cristalinos de cerdo.	73
4.2.1. Obtención de los ojos de cerdo.	73
4.2.2. Extracción del cristalino	74
4.2.3. Fotografía del cristalino	74
4.3. Conservación de los cristalinos	75
4.4. Medición de la transmisión espectral de los cristalinos.	77
4.4.1. Manipulación de los cristalinos.	77
4.4.2. Descripción de los aparatos de medida.	80
4.4.3. Medidas.	86
4.5. Irradiación de los cristalinos.	86
4.5.1. Fuente de radiación UV.	86
4.5.2. Protocolo de medición.	88
4.5.3. Medidas de protección.	90
4.5.4. Medidas.	91
4.6. Cálculos estadísticos.	93
4.7. Referencias de materiales y métodos	94
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.</b>	<b>95</b>
5.1. Manipulación del cristalino de cerdo.	97
5.2. Conservación de los cristalinos.	101
5.2.1. Cristalino recién extraído o “en fresco”.	101
5.2.2. Cristalino en suero salino fisiológico.	103
5.2.3. Cristalino en formol.	104
5.2.4. Cristalino en aceite de ricino.	105
5.2.5. Cristalino criocongelado.	108



<b>5.3. Transmisión espectral de los cristalinos.</b>	109
<b>5.4. Efecto de la radiación UV sobre el cristalino de cerdo.</b>	119
<b>5.4.1. Radiación UVA.</b>	120
<b>5.4.2. Radiación UV (A+B).</b>	140
<b>5.4.3. Comparación del efecto de la radiación UVA vs radiación UV (A+B).</b>	160
<b>5.4.4. Formación de opacidades.</b>	162
<b>5.5. Comparación de los resultados con el cristalino humano.</b>	166
<b>5.6. Estudio preliminar de la regeneración del cristalino tras exposición a la radiación UV.</b>	171
<b>5.7. Referencias de resultados y discusión.</b>	174
<b>6. CONCLUSIONES.</b>	179
<b>7. RESUMEN Y ABSTRACT.</b>	183
<b>8. FUTURAS INVESTIGACIONES.</b>	189
<b>9. ANEXO I. TRABAJOS PUBLICADOS.</b>	139

**ÍNDICE DE ABREVIATURAS**  
**(Por orden de aparición)**

UV	Ultravioleta
UVA	Ultravioleta A
UVB	Ultravioleta B
nm	Nanómetros
IR	Infrarrojo
W	Vatio
Km	Kilómetro
O <sub>2</sub>	Oxígeno
O <sub>3</sub>	Ozono
NASA	National Aeronautics and Space Administration (Administración Nacional de la Aeronáutica y del Espacio)
CIE	Comisión Internacional de Iluminación
UVC	Ultravioleta C
IRA	Infrarrojo A
IRB	Infrarrojo B
IRC	Infrarrojo C
°N	Grados Norte
E.E.U.U.	Estados Unidos
Cd/m <sup>2</sup>	Candelas metro cuadrado
ADN	Ácido desoxirribonucleico
kJ/m <sup>2</sup>	Kilojulios por metro cuadrado
mW/cm <sup>2</sup>	Miliwatios por centímetro cuadrado
3OHKG	3-hidroxikinurenina glucósido
3OHKyn	3-hidroxikinirenina
s	Segundo
Xe	Xenon
Na <sup>+</sup>	Sodio
Ca <sup>++</sup>	Calcio
DMT	Dosis máxima tolerable
h	Hora
WHO	World Health Organization (Organización Mundial de la Salud)
WMO	World Meteorological Organization (Organización Mundial

	Meteorológica)
UNEP	United Nations Environment Programme (Programa de Medio Ambiente de las Naciones Unidas)
ICNIRP	International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection (Comisión Internacional de Protección de Radiaciones No-ionizantes)
UVI	Global Solar UV Index (Índice de Ultravioleta Solar Global)
mm	milímetros
F	Potencia dióptrica
f	Longitud focal
g	Gramos
FOM	FISABIO Oftalmología Médica
SSF	Suero salino fisiológico
SD	Desviación estándar
°C	Grados centígrados
NIR	Infrarrojo cercano
HL	Lámpara halógena
DL	Lámpara de deuterio
AIDO	Instituto Tecnológico de Óptica, Color e Imagen
T0	Tiempo 0 minutos
T5	Tiempo 5 minutos
T10	Tiempo 10 minutos
T20	Tiempo 20 minutos
T30	Tiempo 30 minutos
mm <sup>2</sup>	Milímetros cuadrados
ERG	Electrorretinograma

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1</b> Espectro electromagnético. (Fuente: Climate Science Investigations (CSI), NASA. <a href="http://www.ces.fau.edu/nasa">www.ces.fau.edu/nasa</a> )	<b>31</b>
<b>Figura 2</b> Emisión espectral de la luz solar, según estándar de la NASA, que llega a la superficie de la tierra para una masa de aire igual a 2 (Wyszecki and Stiles, 2000)	<b>32</b>
<b>Figura 3</b> Evolución temporal de la radiación solar global, UV(A+B) y relativa en la latitud mediterránea (adaptado de Martínez-Lozano et al, 1999).	<b>35</b>
<b>Figura 4</b> Espectros de acción de la córnea y el cristalino del conejo relativo al umbral de energía irradiada. Córnea (puntos); Cristalino (cuadrados). En el caso del cristalino se refiere a daños reversibles (Pitts et al., 1977).	<b>39</b>
<b>Figura 5</b> Diferencias en la luz dispersa (scattering) por el cristalino como una función de la dosis de radiación UVB. La línea continua es el mejor ajuste de un polinomio de segundo orden. La flecha vertical indica el DTM que era $69.0 \text{ kJ/m}^2$ (Mody Jr. et al., 2012).	<b>40</b>
<b>Figura 6</b> Toxicidad de la radiación ultravioleta en el cristalino de la rata, en función de la edad. La toxicidad se cuantifica como la dosis máxima aceptable (MAD, del inglés) (Dong et al., 2003).	<b>42</b>
<b>Figura 7</b> Espectro de acción para una cataratogénesis aguda producida por radiación UV sobre un cultivo de cristalino de cerdo. $ED_{50}$ (Dosis Media Efectiva), es decir, umbral de energía UV que produce daños en la mitad de las muestras del cultivo de cristalinos (Oriowo et al., 2001).	<b>43</b>
<b>Figura 8</b> Espectro de acción correspondiente a la radiación UV que produce la muerte de las células epiteliales del cristalino del cerdo, construido a partir del $LD_{50}$ (exposición requerida para la muerte del 50% de las células) proporcionado por la tinción por cristal de violeta (CV) y por la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) (Okuno et al., 2012).	<b>45</b>
<b>Figura 9</b> Corte de un cristalino donde se observan las diferentes estructuras.	<b>51</b>
<b>Figura 10</b> Fotomicrografía de la zona germinativa del cristalino (cerca de su ecuador), que permite ver el proceso activo de formación de las fibras del cristalino desde el epitelio subcapsular. Puede observarse la cápsula gruesa (a) y la capa subyacente de fibras del cristalino nucleadas durante su diferenciación (b). Las fibras del cristalino maduras carecen de núcleo como puede observarse (c). Imagen tomada a 200x.	<b>51</b>
<b>Figura 11</b> Parámetros ópticos y biométricos del cristalino del cerdo (Vilupuru and Glasser, 2001).	<b>56</b>
<b>Figura 12</b> Principales parámetros ópticos y biométricos del cristalino del cerdo doméstico	<b>57</b>

(Vilupuru and Glasser, 2001).

<b>Figura 13</b>	Portacristalinos utilizado en el estudio. Se observa cómo el cristalino de la izquierda ha sido irradiado con UV, mientras que el de la derecha permanece intacto.	<b>77</b>
<b>Figura 14</b>	Dimensiones de los portacristalinos diseñados para los experimentos.	<b>78</b>
<b>Figura 15</b>	Portacristalinos para la medida de la transmisión espectral.	<b>78</b>
<b>Figura 16</b>	Portacristalinos para la medida en húmedo con la cubeta transparente correspondiente.	<b>79</b>
<b>Figura 17</b>	Portacristalinos para la medida en seco de la transmisión espectral. Se aprecia que el cristalino de la izquierda ha sido irradiado con UV y presenta opacidad.	<b>79</b>
<b>Figura 18</b>	Espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 800 (UV/VIS).	<b>80</b>
<b>Figura 19</b>	Esquema del sistema óptico de los espectrofotómetros utilizados en el estudio.	<b>81</b>
<b>Figura 20</b>	Esfera integradora del espectrofotómetro P-E Lambda 800. Se corresponde con la caja negra que se observa señalada por la flecha y que por el interior está revestida interiormente de un blanco perfecto.	<b>83</b>
<b>Figura 21</b>	Orificio de entrada de la esfera integradora del espectrofotómetro P-E Lambda 800.	<b>83</b>
<b>Figura 22</b>	Orificio de entrada de la esfera integradora del espectrofotómetro P-E Lambda 800, con una lente intraocular colocada en dicho orificio.	<b>84</b>
<b>Figura 23</b>	Espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 35 (UV/VIS).	<b>85</b>
<b>Figura 24</b>	Compartimento del espectrofotómetro P-E Lambda 35 donde se ve la esfera integradora (marcada con letras) y el habitáculo cuadrado (a la derecha de la esfera, marcado con una flecha) donde se colocaban las lentes dentro del portacristalinos.	<b>85</b>
<b>Figura 25</b>	Fuente de luz ultravioleta Asahi-Spectra Lax-C100.	<b>86</b>
<b>Figura 26</b>	Fibra óptica flexible para irradiar directamente el cristalino colocado en el porta.	<b>87</b>
<b>Figura 27</b>	Cristalino de cerdo colocado en el portacristalinos.	<b>88</b>
<b>Figura 28</b>	Colocación de la lente dentro del portacristalinos en el espectrofotómetro para la medida de la transmisión espectral.	<b>88</b>
<b>Figura 29</b>	El portacristalinos colocado en posición horizontal y delante de la fibra óptica que emitía la radiación ultravioleta para su irradiación.	<b>89</b>
<b>Figura 30</b>	Irradiación del cristalino colocado en posición horizontal en la pinza. Como las bandas de radiación utilizadas llegaban hasta 400 nm y el espectro visible se extiende más o menos desde el 380 nm, se puede observar algo de luz azul.	<b>89</b>
<b>Figura 31</b>	Medidas de protección frente a la radiación ultravioleta.	<b>90</b>
<b>Figura 32</b> <b>y 33</b>	Cristalinos de cerdo recién extraídos con fondo de papel de filtro blanco y milimetrado.	<b>98</b>
<b>Figura 34</b>	Deterioro del cristalino recién extraído por manipulación.	<b>99</b>
<b>Figura 35</b>	Portacristalinos utilizado en el estudio. Se observa cómo el cristalino de la	<b>100</b>

izquierda ha sido irradiado con UV, mientras que el de la derecha permanece intacto.

- Figura 36** Transmisiones espectrales de 6 cristalinos de cerdo recién extraídos y conservados durante pocos minutos en suero fisiológico, así como su media. **101**
- Figura 37** Transmisión espectral del cristalino de cerdo recién extraído (Suero) y después de 24 horas conservado en suero fisiológico (Suero 24h). **103**
- Figura 38** Transmisión espectral del cristalino de cerdo conservado en formol 24h en función del tiempo de conservación. **104**
- Figura 39** Transmisiones espectrales de cuatro cristalinos de cerdo medidas 48 horas después de haber estado sumergidos en formol. Mostramos también la media correspondiente. **105**
- Figura 40** Transmisión espectral del cristalino de cerdo conservado en aceite de ricino en función del tiempo de conservación. **106**
- Figura 41** Transmisión espectral de dos láminas de vidrio de 0.1 mm de espesor, medidas en aire y con una fina película de aceite de ricino en ambas caras. **107**
- Figura 42** Transmisión espectral de un cristalino de cerdo conservado en criocongelación durante 4 semanas a  $-80^{\circ}$ , medida en diferentes tiempos después de la descongelación. **108**
- Figura 43** Curvas de transmisión espectral correspondientes a 12 cristalinos medidos inmediatamente después de su extracción del ojo. **110**
- Figura 44** Media de la transmisión espectral de las lentes de pollo (Chicken, en inglés), cuervo (Crow, en inglés), codorniz (Quail, en inglés), rata (Rat, en inglés), conejo (Rabbit, en inglés) y cerdo (Pig, en inglés). El eje vertical representa la transmisión en %, el eje horizontal representa las longitudes de onda en nm. (Tsukahara et al., 2014) **112**
- Figura 45** Media de la transmisión espectral de la córnea (A) y el vítreo (B) del pollo (Chicken, en inglés), cuervo (Crow, en inglés), codorniz (Quail, en inglés), rata (Rat, en inglés), conejo (Rabbit, en inglés) y cerdo (Pig, en inglés). El eje vertical representa la transmisión en %, el eje horizontal representa las longitudes de onda en nm. (Tsukahara et al., 2014) **113**
- Figura 46** Funciones de sensibilidad espectral para ratones. Curva superior obtenida mediante ERG registrado con fotometría de parpadeo. Curva inferior obtenida adaptando el ojo a longitudes de onda largas (Figura obtenida de Jacobs et al, 1991). **115**
- Figura 47** Transmisión espectral del cristalino de cerdo común. Media e Intervalo de confianza (Max y Min) de doce (a) y tres (b) cristalinos. **116**
- Figura 48** Transmisión espectral de un cristalino de cerdo medido 6 veces consecutivas durante una hora. **118**
- Figura 49** Media de la transmisión espectral de 3 cristalinos.  $T_0$ = Transmitancia del cristalino recién extraído;  $T_5$ = transmitancia de los cristalinos irradiados (5 **121**

	minutos, intensidad de 10 J/cm <sup>2</sup> ).	
<b>Figura 50</b>	Media de la transmisión espectral de 3 cristalinos. T0 corresponde al cristalino recién extraído; T20 irradiado 20 minutos con UVA y una intensidad de 10 J/cm <sup>2</sup> .	<b>122</b>
<b>Figura 51</b>	Media de la transmisión espectral de 3 cristalinos. T0 corresponde al cristalino recién extraído; T30 irradiado 30 minutos con UVA y una intensidad de 10 J/cm <sup>2</sup> .	<b>123</b>
<b>Figura 52</b>	Variación de la transmisión espectral del cristalino del cerdo irradiado con radiación UVA (315-400 nm) y con una intensidad de 10 J/cm <sup>2</sup> , para diferentes tiempos de exposición: T0 (sin irradiar); T5 (5 minutos); T20 (20 minutos); T30 (30 minutos).	<b>124</b>
<b>Figura 53</b>	Media de la transmisión espectral de 3 cristalinos. T0 corresponde al cristalino recién extraído; T5 irradiado 5 minutos con UVA y una intensidad de 20 J/cm <sup>2</sup> .	<b>127</b>
<b>Figura 54</b>	Media de la transmisión espectral de 3 cristalinos. T0 corresponde al cristalino recién extraído; T20 irradiado 20 minutos con UVA y una intensidad de 20 J/cm <sup>2</sup> .	<b>128</b>
<b>Figura 55</b>	Media de la transmisión espectral de 3 cristalinos. T0 corresponde al cristalino recién extraído; T30 irradiado 30 minutos con UVA y una intensidad de 20 J/cm <sup>2</sup> .	<b>129</b>
<b>Figura 56</b>	Variación de la transmisión espectral del cristalino del cerdo irradiado con radiación UVA (315-400 nm) y con una intensidad de 20 J/cm <sup>2</sup> , para diferentes tiempos de exposición: T0 (sin irradiar); T5 (5 minutos); T20 (20 minutos); T30 (30 minutos).	<b>130</b>
<b>Figura 57</b>	Comparación entre intensidad de la radiación por el tiempo de exposición para dos situaciones diferentes: 10 J/cm <sup>2</sup> durante 20 minutos exposición comparado con 20 J/cm <sup>2</sup> y 5 minutos de exposición.	<b>132</b>
<b>Figura 58</b>	Comparación entre intensidad de la radiación por el tiempo de exposición para dos situaciones diferentes: 10 J/cm <sup>2</sup> durante 30 minutos exposición comparado con 20 J/cm <sup>2</sup> y 20 minutos de exposición.	<b>132</b>
<b>Figura 59</b>	Efecto del tiempo de exposición. Comparación entre los cristalinos irradiados con radiación UVA durante 5 (T5), 20 (T20) y 30 (T30) minutos e intensidad 10 J/cm <sup>2</sup> . T0, cristalino sin irradiar.	<b>133</b>
<b>Figura 60</b>	Efecto del tiempo de exposición. Comparación entre los cristalinos irradiados con radiación UVA durante 5 (T5), 20 (T20) y 30 (T30) minutos e intensidad 20 J/cm <sup>2</sup> . T0, cristalino sin irradiar. Además de la disminución general de la transmitancia con el tiempo de exposición, se puede notar la disminución de la banda de ultravioleta característica de la curva de transmisión del cristalino del cerdo.	<b>134</b>
<b>Figura 61</b>	Variación de la transmisión espectral del cristalino de cerdo para las dos intensidades (10 y 20 J/cm <sup>2</sup> ) de radiación UVA utilizadas y un tiempo de	<b>135</b>

	exposición de 5 minutos.	
<b>Figura 62</b>	Variación de la transmisión espectral del cristalino de cerdo para las dos intensidades (10 y 20 J/cm <sup>2</sup> ) de radiación UVA utilizadas y un tiempo de exposición de 20 minutos.	<b>136</b>
<b>Figura 63</b>	Variación de la transmisión espectral del cristalino de cerdo para las dos intensidades (10 y 20 J/cm <sup>2</sup> ) de radiación UVA utilizadas y un tiempo de exposición de 30 minutos.	<b>136</b>
<b>Figura 64</b>	Variación de la transmisión espectral del cristalino de cerdo para las dos intensidades (10 y 20 j/cm <sup>2</sup> ) de radiación UVA utilizadas y tiempos de exposición de 5, 20 y 30 minutos.	<b>137</b>
<b>Figura 65</b>	Comparación de la distribución de la energía relativa en al zona de 300 a 400 nm (UV A+B), de los espectros solar y de lámpara de Xe.	<b>140</b>
<b>Figura 66</b>	Media de la transmisión espectral de 3 cristalinos. T0 corresponde al cristalino recién extraído; T5 irradiado 5 minutos con UVB y una intensidad de 10 J/cm <sup>2</sup> .	<b>141</b>
<b>Figura 67</b>	Media de la transmisión espectral de 3 cristalinos. T0 corresponde al cristalino recién extraído; T10 irradiado 10 minutos con UVB y una intensidad de 10 J/cm <sup>2</sup> .	<b>142</b>
<b>Figura 68</b>	Media de la transmisión espectral de 3 cristalinos. T0 corresponde al cristalino recién extraído; T20 irradiado 20 minutos con UVB y una intensidad de 10 J/cm <sup>2</sup> .	<b>143</b>
<b>Figura 69</b>	Efecto del tiempo de exposición. Comparación entre los cristalinos irradiados con radiación UV(A+B) durante 5 (T5), 10 (T10) y 20 (T20) minutos e intensidad 10 J/cm <sup>2</sup> . T0, cristalino sin irradiar.	<b>144</b>
<b>Figura 70</b>	Media de la transmisión espectral de 3 cristalinos. T0 corresponde al cristalino recién extraído; T5 irradiado 5 minutos con UVB y una intensidad de 20 J/cm <sup>2</sup> .	<b>147</b>
<b>Figura 71</b>	Media de la transmisión espectral de 3 cristalinos. T0 corresponde al cristalino recién extraído; T10 irradiado 10 minutos con UVB y una intensidad de 20 J/cm <sup>2</sup> .	<b>148</b>
<b>Figura 72</b>	Media de la transmisión espectral de 3 cristalinos. T0 corresponde al cristalino recién extraído; T20 irradiado 20 minutos con UVB y una intensidad de 20 J/cm <sup>2</sup> .	<b>149</b>
<b>Figura 73</b>	Efecto del tiempo de exposición. Comparación entre los cristalinos irradiados con radiación UV(A+B) durante 5 (T5), 10 (T10) y 20 (T20) minutos e intensidad 20 J/cm <sup>2</sup> . T0, cristalino sin irradiar.	<b>150</b>
<b>Figura 74</b>	Efecto del tiempo de exposición. Comparación entre los cristalinos irradiados con radiación UV(A+B) durante 5 (T5), 10 (T10) y 20 (T20) minutos e intensidad 10 J/cm <sup>2</sup> . T0, cristalino sin irradiar.	<b>152</b>
<b>Figura 75</b>	Efecto del tiempo de exposición. Comparación entre los cristalinos irradiados con radiación UV(A+B) durante 5 (T5), 10 (T10) y 20 (T20) minutos e intensidad 20 J/cm <sup>2</sup> . T0, cristalino sin irradiar.	<b>153</b>



<b>Figura 76</b>	Variación de la transmisión espectral del cristalino de cerdo para las dos intensidades de radiación UVB utilizadas y un tiempo de exposición de 5 minutos.	<b>154</b>
<b>Figura 77</b>	Variación de la transmisión espectral del cristalino de cerdo para las dos intensidades de radiación UVB utilizadas y un tiempo de exposición de 10 minutos.	<b>155</b>
<b>Figura 78</b>	Variación de la transmisión espectral del cristalino de cerdo para las dos intensidades de radiación UVB utilizadas y un tiempo de exposición de 20 minutos.	<b>155</b>
<b>Figura 79</b>	Variación de la transmisión espectral del cristalino de cerdo para las dos intensidades de radiación UVB utilizadas y todos los tiempos de exposición utilizados.	<b>156</b>
<b>Figura 80</b>	Comparación de dos cristalinos irradiados durante 5 minutos con UVA y UV(A+B) e intensidades de 20 y 10 J/cm <sup>2</sup> respectivamente.	<b>161</b>
<b>Figura 81</b>	Comparación de varios cristalinos irradiados durante 10, 20 y 30 minutos con UVA y UV(A+B) e intensidades de 20 y 10 J/cm <sup>2</sup> .	<b>161</b>
<b>Figura 82</b>	Fotografías de cristalinos de cerdo. a) cristalino recién extraído. b) cristalino irradiado 20 minutos con I=20 J/cm <sup>2</sup> . Densidad leve (flecha). c) Densa catarata CSA producida por 30 minutos de exposición e I=20 J/cm <sup>2</sup> .	<b>164</b>
<b>Figura 83</b>	Cristalinos de cerdo. a) Sin irradiar. b) Irradiado 10 minutos con UV(A+B). c) Irradiado 20 minutos con UV(A+B).	<b>165</b>
<b>Figura 84</b>	Comparación de la transmisión espectral del cristalino de cerdo con el humano. Curva del cristalino humano de 4 1/2 años adaptada Boettner&Wolter (Boettner y Wolter, 1962). Curva del cristalino humano de 30 años adaptada de Artigas et al, 2012.	<b>167</b>
<b>Figura 85</b>	Comparación entre la transmisión espectral de cristalinos humanos envejecidos. Las líneas continuas corresponden a medias de cristalinos humanos comprendidos entre 60-69 años y 70-79 años (adaptado de Artigas et al, 2012). Las líneas discontinuas corresponden a cristalinos de cerdo irradiados con UV(A+B) e intensidad 20 J/cm <sup>2</sup> y durante 10 y 20 minutos.	<b>170</b>
<b>Figura 86</b>	Transmisión del ojo de cerdo tras radiación UVA (315-400nm) y medida en diferentes tiempos a los 0, 5, 10 20, 65 y 110 minutos de la exposición a los rayos UVA.	<b>171</b>
<b>Figura 87</b>	Transmisión de cristalinos irradiados con UVB y medida en diferentes tiempos.	<b>172</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
<b>Tabla 1</b> Transmisión espectral medida en tanto por cien, para siete longitudes de onda del espectro visible y UVA, de los seis cristalinos de cerdo recién extraídos. (SD = desviación estándar)	<b>102</b>
<b>Tabla 2</b> Transmisión espectral (%), para ocho longitudes de onda del espectro, de doce cristalinos de cerdo recién extraídos, con el valor promedio (Media) y la desviación estándar (SD).	<b>111</b>
<b>Tabla 3</b> Valores de la transmisión espectral (%), para ocho longitudes de onda del espectro, del cristalino de cerdo medido 6 veces durante una hora. Media y desviación estándar (SD).	<b>118</b>
<b>Tabla 4</b> Disminución de la transmisión del cristalino del cerdo relativa a la de un cristalino recién extraído, después de 5 minutos (T5), 20 minutos (T20) y 30 minutos (T30) de ser irradiados con radiación Ultravioleta A de intensidad 10 J/cm <sup>2</sup> , para diferentes longitudes de onda.	<b>125</b>
<b>Tabla 5</b> Disminución de la transmisión del cristalino del cerdo relativa a la de un cristalino recién extraído, después de 5 minutos (T5), 20 minutos (T20) y 30 minutos (T30) de ser irradiados con radiación Ultravioleta A de intensidad 20 J/cm <sup>2</sup> , para diferentes longitudes de onda.	<b>131</b>
<b>Tabla 6</b> ED <sub>50</sub> : Dosis efectiva de radiación a diferentes longitudes de onda que produce 50% probabilidad de daño (Oriowo et al, 2001).	<b>139</b>
<b>Tabla 7</b> Disminución de la transmisión del cristalino del cerdo relativa a la de un cristalino recién extraído, después de 5 minutos (T5), 10 minutos (T10) y 20 minutos (T20) de ser irradiados con radiación Ultravioleta A+B de intensidad 10 J/cm <sup>2</sup> , para diferentes longitudes de onda.	<b>144</b>
<b>Tabla 8</b> Disminución de la transmisión del cristalino del cerdo relativa a la de un cristalino recién extraído, después de 5 minutos (T5), 10 minutos (T10) y 20 minutos (T20) de ser irradiados con radiación Ultravioleta A+B de intensidad 20 J/cm <sup>2</sup> , para diferentes longitudes de onda.	<b>150</b>

# **INTRODUCCIÓN**



Las cataratas son la principal causa de ceguera en todo el mundo (West, 2000; Brian and Taylor, 2001; Evans et al, 2004; Galichanin *et al*, 2010). La radiación ultravioleta (UV) es uno de los factores más influyentes en la formación de opacidades del cristalino tanto en humanos como en animales (Taylor *et al*, 1988; Sliney, 1997; Ayala *et al*, 2000). Sin embargo, resulta complicado determinar con precisión esta influencia, ya que es difícil aislar el efecto de la radiación UV de otros factores que también puedan influir en la formación de opacidades de la lente. Aún así, se han llevado a cabo estudios epidemiológicos con el objeto de analizar el efecto que la exposición a la luz solar, particularmente a las radiaciones ultravioletas A (UVA) y B (UVB), tiene en la formación de cataratas (Taylor *et al*, 1988; Söderberg, 1990; McCarty *et al*, 2000; Oriowo *et al*, 2002b; Dong *et al*, 2003; Sasaki *et al*, 2003). La luz solar es la principal fuente de radiación UV a la que están sometidos tanto los humanos como los animales (Pitts, 1990; Galichanin *et al*, 2010).

El efecto de la radiación sobre un ser vivo depende de tres factores: el tipo de radiación, su intensidad y el tiempo de exposición. Monitorizar estos tres factores de forma precisa en una población extensa y durante un largo periodo de tiempo es un objetivo difícil. Además, no sólo habría que considerar parámetros ópticos y radiométricos, sino también factores geométricos de exposición (como el ángulo de incidencia de la luz, la superficie irradiada...) (Sliney, 1997), así como factores genéticos y de tipo de vida de la población estudiada (edad, profesión al aire libre, hábitos, predisposición genética a enfermedades...) (McCarty *et al*, 2000). Determinar la dosis de exposición solar que causa cataratas (Sliney, 1997) en el ser humano es complicado; aún así se han llevado a cabo estudios epidemiológicos, como el proyecto "Chesapeake Bay" (Taylor *et al*, 1988), que analizó el desarrollo de opacidades oculares en pescadores a los que se supone sobreexpuestos a la radiación UV, y el proyecto desarrollado en *Beaver Dam (Wisconsin)* (Cruickshanks *et al*, 1992), el cual estudió también la influencia de la radiación UV sobre la formación de cataratas en personas que vivían en dicha ciudad de entre 43 y 84 años. Ambos estudios revelan una correlación significativa entre la exposición a la radiación UVB y el aumento de la frecuencia de aparición de opacidades corticales en el cristalino.

Más recientemente, McCarty *et al* (2000) y Sasaki *et al* (2003) estudiaron la influencia de la radiación UVB en el desarrollo de cataratas corticales, el primero en la región de Victoria (Australia) y el segundo en Reikiavik (Islandia), Melbourne (Australia) y Singapur (Malasia). En este segundo estudio, además de determinar la diferencia entre cataratas en diferentes latitudes debido al diferente ángulo de incidencia de la luz, también distingue entre razas: el iris marrón oscuro típico de Singapur absorbe más luz solar que los

iris claros de las razas nórdicas, y por tanto, estas personas tienen una mayor predisposición a sufrir cataratas.

El cerdo es un animal que desde hace 20 años ha empezado a considerarse en investigación oftalmológica debido a su similitud filogenética con el ser humano (Chu *et al*, 2008; Kivell *et al* 2009; Middleton, 2010). Hay importantes analogías entre ambas especies, como que el hecho de que el ojo de cerdo no tiene *tapetum lucidum* como tienen la mayoría de mamíferos no primates, posee una vascularización retinal holangiótica, conos en la retina externa (Ruiz-Ederra, 2005) y un espesor escleral similar al ojo humano (Olsen *et al* 2002). Actualmente se conocen similitudes entre los fotorreceptores de la retina porcina y la humana (Chandler *et al* 1999). Por todo ello, los modelos de ojo de cerdo se han desarrollado para el estudio del transporte de fármacos a través de la esclera (Olsen *et al* 2002) o de enfermedades como la retinosis pigmentaria, el glaucoma, el desprendimiento de retina (Olsen *et al* 2002, Petters *et al* 1997, Landiev *et al* 2006). Sin embargo, son escasos los estudios sobre la fisiología y patología del ojo del cerdo debido a que raramente se le trata como animal de compañía, más bien de estabulación, y por tanto no se le trata clínicamente como individuo.

Existen algunos estudios realizados sobre el cristalino del cerdo. Así, Vilupuru y Glasser (2001) estudiaron las características ópticas y biométricas del mismo, obteniendo los ojos de un matadero. Estos autores en sus hallazgos encontraron relaciones lineales entre dichas propiedades biométricas (curvatura anterior y posterior de la lente, espesor, diámetro) y la óptica, que se refiere a la longitud focal.

En referencia a la acción de la radiación UV en el cristalino del cerdo, Oriowo *et al* (2001) analizaron *in vitro* el espectro de acción en una cataratogénesis aguda por UV usando cultivos de células epiteliales de cristalinos, exponiéndolas a una banda de longitudes de onda entre 270 y 370 nm y determinando la intensidad umbral que producía daños reversibles y permanentes. En este mismo sentido, Okuno *et al* (2012) realizaron un estudio similar para determinar el espectro de acción UV que produce la muerte de las células epiteliales del cristalino del cerdo, usando la banda de longitudes de onda comprendida entre 235 y 311 nm. Estas investigaciones son particularmente importantes para el estudio de la cataratogénesis y demuestran que la región comprendida entre 270 y 315 nm es en general la más peligrosa para el cristalino.

Sin embargo, a la superficie de la tierra no llegan procedentes del sol radiaciones por debajo de los 300 nm (Martínez-Lozano *et al* 1999, Tena *et al* 2000, Cañada *et al* 2008), gracias al filtro de la atmósfera y la capa de ozono, ni tampoco las fuentes de luz artificiales

emiten por debajo de los 400 nm (Artigas *et al* 2011). Por lo tanto en condiciones naturales, la formación de opacidades en el ojo debidas a la radiación UV no puede ser debida a radiaciones por debajo de los 300 nm.





# **OBJETIVOS**



## OBJETIVOS

Como **objetivo general** se plantea estudiar el efecto de la radiación UV directa sobre el cristalino de cerdo *in vitro*, a través de su transmisión espectral. Para ello, utilizaremos una fuente de radiación que emita un espectro similar al solar en la región del UV, bloqueando las radiaciones inferiores a 300 nm. Esto permitirá que los resultados obtenidos puedan, con las debidas reservas, extrapolarse a la situación atmosférica en que vivimos.

Para ello, se plantean los siguientes **objetivos parciales**:

- Estudiar distintos métodos de conservación de los cristalinos para valorar posibles influencias sobre la transmisión espectral.
- Establecer la curva de transmisión espectral estándar del cristalino del cerdo común *in vitro*, y comprobar posibles variaciones de la curva con respecto al tiempo.
- Determinar los efectos de las radiaciones UVA y UVB sobre la transmisión espectral del cristalino del cerdo *in vitro*, a diferentes intensidades y tiempos de exposición.
- Comprobar la posible capacidad de recuperación *in vitro* en la transmisividad de los cristalinos irradiados a distintos tiempos.
- Comparar nuestros resultados con los existentes en la bibliografía en diferentes especies.

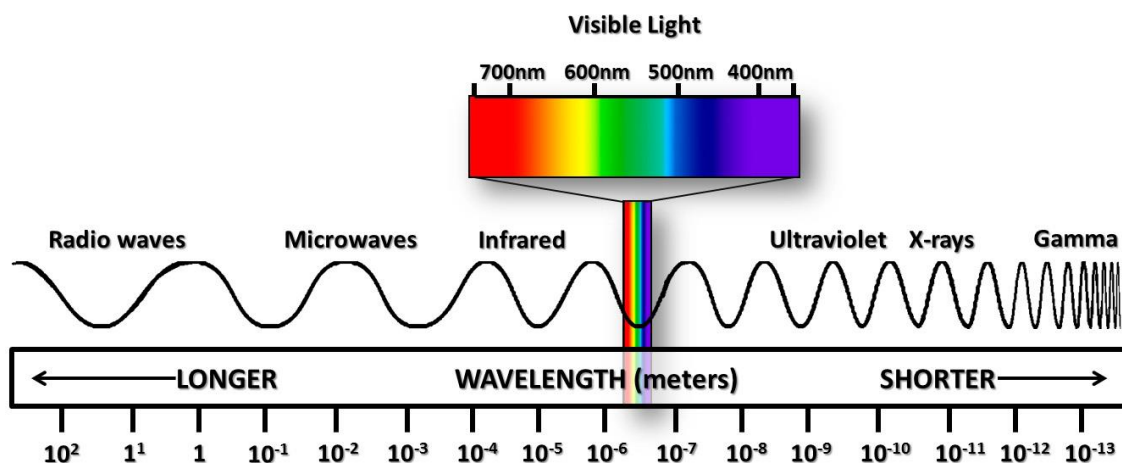


# **INTRODUCCIÓN TEÓRICA**



### 3.1. LA RADIACIÓN ULTRAVIOLETA

El espectro electromagnético está constituido por los rayos  $\gamma$ , los rayos X, la radiación ultravioleta (UV), la radiación visible, la radiación infrarroja (IR), las ondas microondas y las ondas de radiofrecuencia.



**Figur**

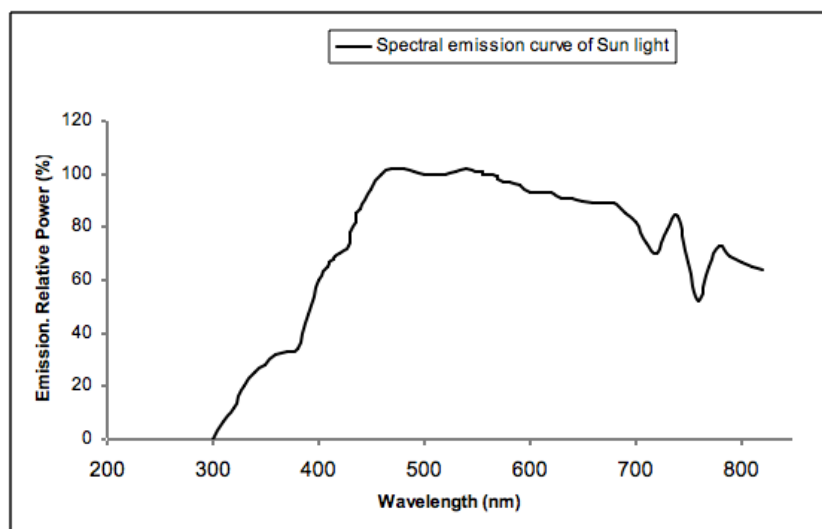
**a 1.** Espectro electromagnético. (Fuente: Climate Science Investigations (CSI), NASA. [www.ces.fau.edu/nasa](http://www.ces.fau.edu/nasa))

La constante solar se define como la totalidad de la potencia radiante recibida del sol medida en wátios (W) por unidad de área (metros cuadrados), en la media de distancia entre la Tierra y el Sol en ausencia de la atmósfera (Nasa, 2011). La radiación solar total incluye tanto la radiación solar directa como la indirecta o difusa. De dicha radiación, el 96% corresponde a longitudes de onda entre 270 y 2600 nm, de los cuales el 49,6% pertenece al espectro de luz visible, entre 400 y 760 nm (Pitts, 1990).

Una vez atraviesa la atmósfera, esta radiación se ve menguada por la absorción entre los 100.000 a 30.000 Km de altitud, de la franja del espectro entre los 85 a 200 nm, principalmente por el oxígeno ( $O_2$ ). A los 30.000 km y más cerca de la superficie terrestre, el ozono ( $O_3$ ) absorbe la radiación UV entre 200 y 288 nm, que como seguidamente veremos, corresponde a la radiación ultravioleta C (UVC). Por ello, pequeños cambios en el  $O_2$  estratosférico, nitrógeno y  $O_3$  pueden alterar dicha absorción y por tanto, la cantidad de

radiación que alcanza a la vida en general de la superficie terrestre (Ayala et al., 2000; Pitts, 1990).

Por lo tanto, la radiación solar que llega a la Tierra ocupa un rango en el espectro electromagnético que incluye tanto la luz visible como la radiación UV y el IR. Como luz solar tomaremos la curva de distribución espectral relativa a la luz de día (datos estándar de la NASA para la irradiancia espectral), que corresponde al iluminante D65 (Figura 2) de la CIE (Comisión Internacional de Iluminación)(Artigas et al., 2012a).



**Figura 2.-** Emisión espectral de la luz solar, según estándar de la NASA, que llega a la superficie de la tierra para una masa de aire igual a 2. (Wyszecki and Stiles, 2000)

De dicha luz solar, la que provoca más efectos dañinos sobre los seres vivos es la radiación UV (100-380 nm) (Brian and Taylor, 2001; Evans et al., 2004; West, 2000), la cual se subdivide en tres rangos. La radiación UVC es absorbida totalmente por la atmósfera, como hemos visto anteriormente, por lo tanto no la incluiremos en el presente estudio. En consecuencia, los efectos biológicos de la radiación solar los asociaremos exclusivamente con las radiaciones UVA y UVB (Diffey, 1991).

Las radiaciones no ionizantes, es decir, las que no son capaces de mover los electrones de átomos a los que inciden, son el UV, el espectro visible y el IR. De acuerdo con la CIE, estas radiaciones se dividen en las siguientes regiones:



- UVC: radiación comprendida entre 100 y 280 nm.
- UVB: radiación comprendida entre 280 y 315 nm.
- UVA: radiación comprendida entre 315 y 380 nm.
- Visible: radiación comprendida entre 380 y 780 nm.
- IRA: radiación comprendida entre 780 y 1400 nm
- IRB: radiación comprendida entre 1400 y 3000nm.
- IRC: radiación comprendida entre 3000 y 1.000.000 nm.

Los cambios entre estas regiones se establecen de acuerdo con la eficacia de la radiación para producir diferentes efectos biológicos. (Artigas et al., 1995)

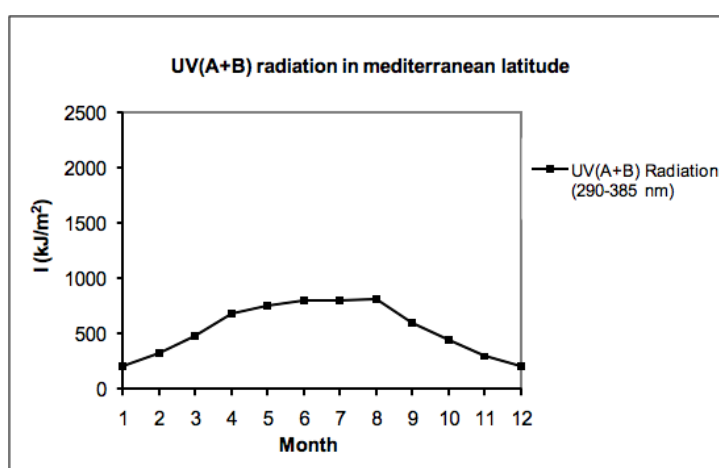
Por lo tanto, las zonas de la franja del espectro de la radiación solar sobre las que vamos a incidir en este estudio son el UVA (315-380 nm) y el UVB (280-315 nm). Su efecto sobre los seres vivos no sólo depende de su composición espectral (banda de espectro) sino también de su intensidad y del tiempo de exposición, por lo que es muy difícil determinar experimentalmente qué dosis de radiación comienza a ser perjudicial para el ojo. Además, no sólo se tienen que considerar dichos parámetros ópticos, sino también los factores geométricos de la exposición como por ejemplo la diferencia estacional que ocurre en la manera de incidir los rayos solares, en invierno es oblicua y en verano es más perpendicular a la superficie terrestre (West, 1999). A pesar de dicha dificultad, se han llevado a cabo algunos estudios que revelan una significativa correlación entre la exposición a la radiación UVB y las opacidades corticales del cristalino (Cruickshanks et al., 1992; Sasaki et al., 2003; Taylor et al., 1988).

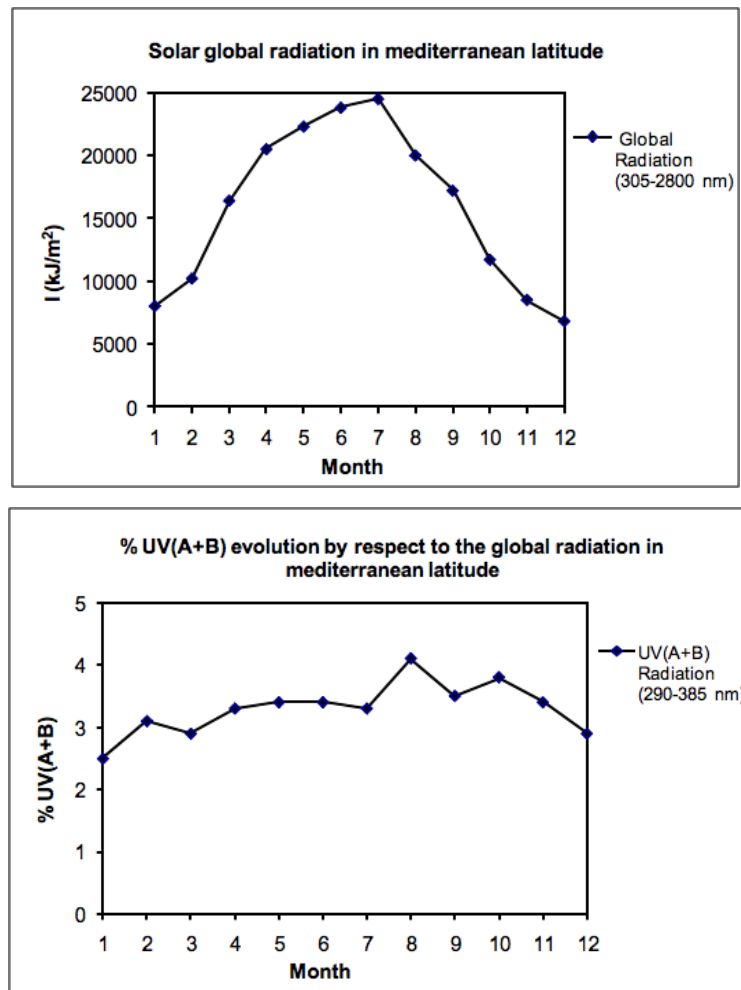
De la constante solar que llega al límite superior de la atmósfera, el 1.3% corresponde a la UVB y el 5,9% a la UVA, el resto es UVC, luz visible y rayos IR. Conforme estos rayos solares van avanzando por la atmósfera, gran parte de la radiación se reduce gracias a la capa de ozono de la estratosfera y diferentes partículas en la atmósfera que absorben parte de dicha radiación. Y así, de la radiación UV total que llega a la superficie terrestre, que es aproximadamente un 13% de la constante solar, tan sólo un 10% se corresponde a UVB y el 90% restante a UVA, variando su intensidad a lo largo del día, del año y de la altitud. Debido a esto, la formación de agujeros en la capa de ozono puede aumentar considerablemente la cantidad de radiación UVB que llega a la superficie de la tierra, de manera que conforme se reduce el espesor de dicha capa, llegan longitudes de onda más cortas pudiendo cambiar de 296 a aproximadamente 288 nm (Martinez-Lozano et al., 1994; Pitts, 1990; Utrillas et al., 1991).

En nuestro estudio se imitan in vitro los datos correspondientes a la radiación solar global y a la radiación UV(A+B) obtenidos a lo largo del año en la localidad mediterránea de Valencia, situada casi exactamente a la latitud de 40°N y a nivel del mar. (Marín et al., 2007; Utrillas et al., 1991) Si consideramos  $\pm 5^\circ$  alrededor de esta latitud, englobaremos no sólo el mediterráneo sino también gran parte de China, Japón y la mayoría de E.E.U.U., es decir la zona más altamente poblada de la tierra y por consiguiente representativa. La Figura 3 muestra para esta latitud la variación de la radiación solar a lo largo del año.

Cuando el sol brilla en la latitud mediterránea, su luminancia media puede alcanzar las 10.000 cd/m<sup>2</sup> (candelas por metro cuadrado) y una intensidad normal (un día medio de sol en latitud mediterránea) sería de alrededor de 5.000 cd/m<sup>2</sup>. Esta intensidad es muy alta y combinada con largos periodos de exposición más o menos directa, podría llegar a causar daños en el ojo (Taylor et al., 1988).

La radiación solar es atenuada, como hemos visto anteriormente, por la absorción y la dispersión (*scattering*) a través de la atmósfera. La dispersión o radiación difusa es una parte importante de la radiación total, ya que representa alrededor del 50% de la radiación UVB que alcanza la superficie de la tierra. Es otra razón para protegerse frente a la radiación UV (A+B). Esta difusión es provocada por las moléculas del aire y otras partículas en suspensión presentes en la atmósfera (Martínez-Lozano et al., 1998; Pedros et al., 1999).





**Figura 3.-** Evolución temporal de la radiación solar global, UV(A+B) y relativa en la latitud mediterránea (adaptado de Martínez-Lozano et al, 1999).

### 3.1.1. Efectos oculares de la radiación ultravioleta

A nivel ocular, la UVA y UVB son parcialmente absorbidas por la córnea y el cristalino, originando cambios a nivel celular, fisiológico y molecular. Las reacciones típicas de la córnea ante la radiación UVA son el edema, queratitis punctata (o queratitis fotoeléctrica) y neovascularización. A nivel histológico, todas las reacciones descritas en el cristalino se localizan a nivel del epitelio y fibras corticales. Por otra parte, la UVB induce la formación de cataratas anteriores subcapsulares y vacuolización de las suturas (Li et al., 1995).

El epitelio del cristalino es la estructura más sensible a radiación UV. Se sabe que la radiación UVB causa hiperplasia del epitelio y degeneración de las suturas anteriores

(Vrensen, 1995; Wegener, 1995). Las células epiteliales son el tejido diana para la radiación UVB, originando opacidades corticales anteriores. La exposición a UVB puede inducir daño del ADN, originando alteraciones de su síntesis, del transporte de membrana, disminución de los niveles de glutatión así como inactivación de otras enzimas.

El cristalino humano está continuamente expuesto a pequeñas cantidades diarias de radiación UV; es sabido que si dicha exposición excede cierta cantidad diaria, el cristalino sufre daños. Diferentes estudios han intentado encontrar los mecanismos bioquímicos que median en la aparición de opacidades de cristalino originadas por la luz UV; actualmente, el mecanismo exacto no es del todo conocido (Kim and Koh, 2011). La apoptosis (o muerte celular programada) es fundamental para el mantenimiento de la homeostasis en los distintos tejidos. Los genes no alterados producen apoptosis de forma normal en diversos procesos controlables y deseables de muerte celular.

Las cataratas generalmente comienzan en el epitelio de la lente, que tiene una baja capacidad de proliferación, aunque pueden incrementarla bajo determinadas circunstancias. Diferentes experiencias in vivo e in vitro han demostrado que el epitelio, tras la exposición a la luz UV es capaz de eliminar las células alteradas y reemplazarlas por células sanas (Hightower et al., 1994).

La proteína p53 es un factor de transcripción nuclear implicado en la apoptosis y proliferación celular que ha sido encontrada en el núcleo de las células epiteliales del cristalino. Ayala y sus colaboradores han descrito la aparición de cataratas en todas las lentes de ratas albinas de raza Sprague–Dawley que estuvieron expuestas a radiación UV (8 kJ/m<sup>2</sup>), y cuantifican una expresión de caspasa 3 y p53 significativamente mayor en las lentes irradiadas en comparación con lentes normales (Ayala et al., 2007). Kim y Koh pusieron de manifiesto la apoptosis celular al exponer un cultivo de células epiteliales del cristalino humano a la luz UV (30 segundos, 0,6 mW/cm<sup>2</sup>), demostrando que promueve el incremento de la expresión de NOXA y caspasa 3 (Kim and Koh, 2011).

Desde hace tiempo se sabe que el cristalino del primate absorbe una cantidad importante de la radiación UVA y UVB que llega a la superficie de la tierra (Boettner and Wolter, 1962). Por lo tanto es importante conocer qué partes del cristalino tienen capacidad de absorber estas radiaciones. Existe unos primeros estudios que investigan este problema pero para la córnea (Kolozsvari et al., 2002), pero muy pocos que hagan lo propio con el cristalino. Artigas *et al* determinan la transmisión espectral del cristalino pero sólo para personas adultas y mayores (Artigas et al., 2012b). Gaillard *et al*, encuentran que en los

primates las capas posteriores del cristalino absorben más radiación UV que las capas anteriores en el intervalo de 300-400 nm.(Gaillard et al., 2000). Un estudio de Dillon *et al* muestra que el núcleo de un cristalino humano envejecido, presenta una absorción de radiación UV más alta que la zona cortical. Por otro lado no existen datos de absorción de radiación UV por parte de la cápsula del cristalino (Dillon et al., 1999).

Los componentes más abundantes conocidos en el filtro UV del cristalino humano de bajo peso molecular, son Kinunerina, 3-hidroxicinurenina glucósido (3OHKG) y 4-(2-amino-3-hidroxifenil)-4-ácido oxobutanoico O-glucósida (Truscott *et al* 1994). Los espectros de UV de estas moléculas, muestran una absorción más alta en los rangos de UVB y UVC que en el del UVA. Los resultados sugieren que estos derivados del tritophan son responsables de la absorción de la radiación UV por el cristalino. Niveles de la proteína-ligada kinurenina y de 3-hidroxicinurenina (3OHKyn) son más altos en el núcleo que en la zona cortical (Hood *et al* 1999). Por otro lado se ha demostrado que la concentración de 3OHKG y 3OHKyn libres es más baja en el núcleo que en la zona cortical (Bova et al., 2001).

Aparte de estos compuestos de bajo peso molecular, las proteínas pueden contribuir significativamente a la absorción de la radiación UV. El cristalino humano posee el contenido más alto en proteínas del organismo y todas las proteínas absorben radiaciones dentro del rango del ultravioleta. (Kyselova, 2010) Las proteínas transparentes del cristalino son las principales constituyentes del mismo y han sido descritas desde hace tiempo y recientemente identificadas mediante espectrometría de masas. (Yao et al., 2010) Estas específicas proteínas lenticulares son determinantes para las propiedades ópticas del ojo, incluyendo la absorción de la radiación UV (Liang et al., 1985a, 1985b).

### **3.1.2. Estudios sobre los efectos de la radiación ultravioleta en el cristalino de diferentes especies de mamíferos.**

#### **3.1.2.1. Conejo**

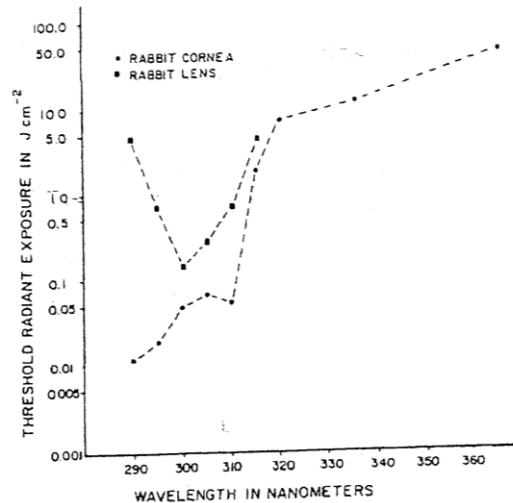
Pitts y sus colaboradores, estudiaron los efectos oculares que produce la banda de radiación UV comprendida entre 295 y 365 nm en el ojo de conejo *in vivo*. Estos autores determinaron concretamente el umbral de intensidad y el tiempo de exposición que

producen daños reversibles o permanentes en la córnea y cristalino en esta especie, con el objetivo de establecer unos estándares de seguridad para los trabajadores que desarrollan su actividad al aire libre y por consiguiente sometidos a la radiación solar (Pitts et al., 1977). Evidentemente, como en tantos otros casos, extrapolan resultados en animales al caso humano. En este caso, encontraron que para una longitud de onda de 300 nm existe un umbral de reversibilidad para la córnea de  $0.05 \text{ J/cm}^2$  y un tiempo de exposición de 137 segundos (s), mientras que para el cristalino es de  $0.15 \text{ J/cm}^2$  y un tiempo de exposición de 661 s, siendo en este caso el daño reversible, estimando el tiempo de recuperación de 3 días. Para el caso de daños permanentes en el cristalino, la intensidad era para 300 nm de  $0.5 \text{ J/cm}^2$  y el tiempo de exposición de 1866 s.

La radiación solar que llega a la tierra no comprende longitudes de onda por debajo de 300 nm, y las fuentes artificiales no emiten por debajo de 400 nm. La banda de radiación UV utilizada en este estudio se aproxima bastante a la que llega a la superficie de la tierra procedente del sol y por consiguiente la podemos considerar como causante de las posibles opacidades provocadas por las actividades al aire libre.

En este trabajo utilizaron una fuente de Xenon (Xe) de 5000 W para irradiar los ojos de los conejos con bandas de radiación de 6.6 nm de anchura y en pasos de 5 en 5 nm desde 295 hasta 320 nm y en intervalos aleatorios a partir de 320 nm. Los criterios con los que determinaron los daños provocados en el caso del cristalino fueron la aparición de opacidades subcapsulares, nebulosidad capsular o estromal, opacidades estromales y aumento de la prominencia en la sutura anterior.

La Figura 4, muestra el espectro de acción relativo a la exposición a la radiación UV para el ojo del conejo en este estudio. Se representa el espectro de acción de la córnea y del cristalino, refiriéndose en este último caso al umbral para daños reversibles.



**Figura 4.-** Espectros de acción de la córnea y el cristalino del conejo relativo al umbral de energía irradiada. Córnea (puntos); Cristalino (cuadrados). En el caso del cristalino se refiere a daños reversibles (Pitts et al., 1977).

Como se observa en la figura, el espectro de acción en el caso del cristalino comienza en la longitud de onda 295 nm y puede extenderse hasta los 335 nm; sin embargo, el intervalo de longitudes de onda más efectivo para producir opacidades en el cristalino es el comprendido entre 295 y 315 nm. Estos autores además recalcan un importante hallazgo de su estudio, y es que exposiciones relativamente cortas de radiación comprendida entre 295 y 315 nm, produce ya opacidades en el cristalino. Como sabemos en la actualidad, el UVB (280-315 nm) es mucho más dañino a efectos biológicos que el UVA (315-380 nm) (Pitts et al., 1977).

En otro estudio en conejo, realizado por Hightower y colaboradores, se expusieron lentes enteras y cultivos de células epiteliales de cristalino a dosis de radiación UV entre dos rangos: 290-340 nm, incluyendo UVB y UVA, y un rango puramente UVB, 303-313 nm. En ambos casos se describió la opacificación de la lente y una pérdida dosis-dependiente de iones de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{++}$ , necesarios para la homeostasis de la lente; además, observaron cambios morfológicos a las 2 horas de la irradiación, y muerte celular a las 20 horas. Estos autores concluyen que la radiación UV produce daño del epitelio del cristalino y cambios en la permeabilidad de la membrana, lo que altera la homeostasis de la lente (Hightower et al., 1994).

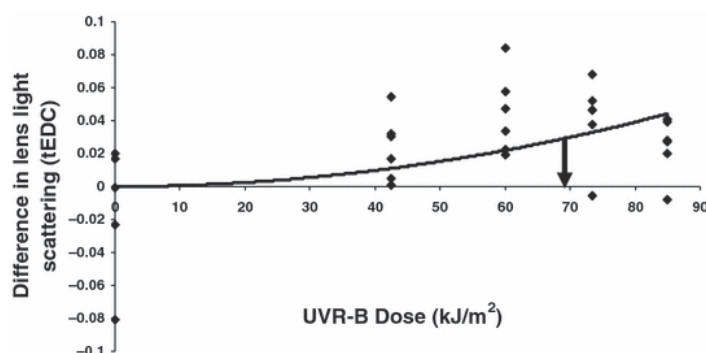
Cejka y colaboradores experimentaron en córneas y lentes de conejo para ver el efecto de dos dosis diferentes de radiación UVA (a 365 nm): los animales fueron sometidos

a una radiación constante durante 5 días de  $1 \text{ J/cm}^2$  en un grupo, y  $2 \text{ J/cm}^2$  en el otro. Estos autores no obtuvieron cambios significativos ni en la córnea ni en la lente a esas dosis tan bajas de radiación (Čejka et al., 2009).

### 3.1.2.2. Cobaya

En la cobaya también se ha estudiado los efectos de la radiación UVA sobre la lente. En un estudio, se les expuso durante 4-5 meses a una radiación UVA de banda 340-410 nm con un pico de 365 nm, a  $0,5 \text{ J/cm}^2$ , observando cambios significativos tanto a nivel morfológico como metabólico en la región central de la lente (Giblin et al., 2002).

Mody y colaboradores, determinaron el umbral de radiación UVB que no llega a producir cataratas en el ojo de la cobaya, es decir la dosis máxima tolerable (DMT) para esta especie. Para ello utilizaron 30 cobayas que recibieron en un solo ojo entre 0 y  $84.9 \text{ kJ/m}^2$  de radiación UVB. Posteriormente se sacrificaron y 24 horas (h) después se les extrajo el cristalino. Para cuantificar el grado de la opacidad, se midió la intensidad de la luz dispersa (scattering) como puede observarse en la Figura 5. El concepto de DMT aplicado lo dedujeron de la curva que se obtenía al representar la luz dispersa en función de la dosis de radiación UVB aplicada (Mody Jr. et al., 2012).



**Figura 5.-** Diferencias en la luz dispersa (scattering) por el cristalino como una función de la dosis de radiación UVB. La línea continua es el mejor ajuste de un polinomio de segundo orden. La flecha vertical indica el DTM que era  $69.0 \text{ kJ/m}^2$  (Mody Jr. et al., 2012).



Estos autores concluyeron que todos los ojos expuestos a la radiación UVB desarrollan siempre cataratas en la región subcapsular anterior, y que la DTM es de 69.0 kJ/m<sup>2</sup>, lo que supone un umbral 10 veces más alto que el obtenido por Pitts *et al* para el conejo (Pitts *et al.*, 1977).

### 3.1.2.3. Rata

La bibliografía muestra numerosos trabajos que ponen de manifiesto la influencia de la radiación UV sobre el cristalino de las ratas (Ayala *et al.*, 2000; Dong *et al.*, 2005, 2003; Michael, 2000; Michael *et al.*, 1998; Soderberg, 1990a, 1990b, 1988).

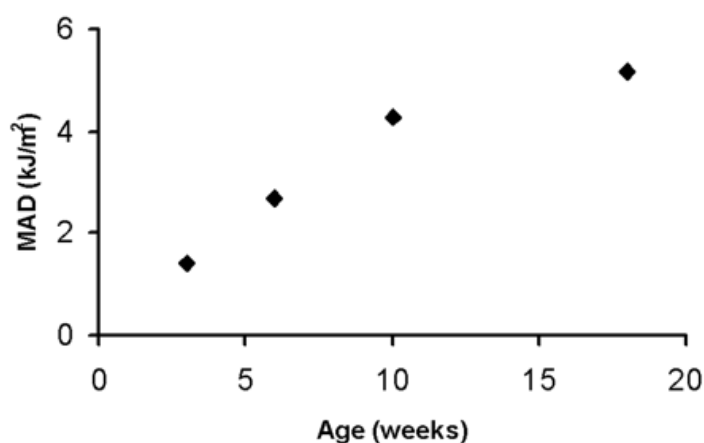
Ayala *et al* analizaron la validez de la ley de reciprocidad de Bunsen-Roscoe para el desarrollo de cataratas producidas por exposición a la radiación UV en ratas de la raza Sprague-Dawley. Esta ley aplicada a esta situación demuestra que el efecto biológico de la radiación UV sobre el cristalino de la rata depende del producto de la intensidad de la radiación por el tiempo de exposición. Para ello, estos autores utilizaron 100 ratas que dividieron en 5 grupos y que fueron irradiadas con tiempos de exposición diferentes (7.5, 15, 30, 60 y 120 minutos), pero todas con la misma intensidad (8 kJ/m<sup>2</sup>). Sus resultados muestran que el tiempo de exposición tiene importancia con dosis bajas, pudiendo decir que con dosis altas se produce una saturación, no afectando ya en el resultado el aumento de intensidad. Es decir, la ley de reciprocidad fotoquímica de Bunsen-Roscoe se cumple pero modulada por la respuesta biológica. El método que estos autores utilizaban para determinar la formación de cataratas era medir la luz esparcida (scattering) por el cristalino (Ayala *et al.*, 2000).

Mody y sus colaboradores afirmaron que para inducir una catarata en este mismo tipo de ratas pero de siete semanas de edad, se necesita una intensidad de radiación UVB de 0.301 J/cm<sup>2</sup>, determinando también que el contenido en ascorbato del cristalino decrece exponencialmente con la exposición a este tipo de radiación. Sin embargo, este trabajo no especifica claramente el tiempo de exposición (Mody Jr. *et al.*, 2006).

Dong *et al* analizaron el impacto de la edad en la formación de cataratas en ratas irradiadas con UV. Los cuatro grupos de ratas utilizados en el estudio correspondían a edades de 3, 6, 10 y 18 semanas y fueron irradiadas con UVB y una intensidad de 8 kJ/m<sup>2</sup>. La dosis máxima aceptable era mucho menor para las ratas jóvenes que para las de más

edad, por lo que estos autores concluyen que las ratas jóvenes son más sensibles a la radiación UVB y que por consiguiente la edad es un parámetro a considerar en estos estudios. También determinaron que la dosis máxima tolerable de UVB para ratas de edades comprendidas entre 18 y 60 semanas variaba entre 0.47 y 0.52 J/cm<sup>2</sup> (Dong et al., 2003).

El método utilizado para evaluar el grado de la catarata fue cuantificar la luz dispersa (scattering) que se producía al pasar la luz a través de la muestra. La Figura 6, muestra la influencia de la edad en la toxicidad en vivo por exposición al UVB.

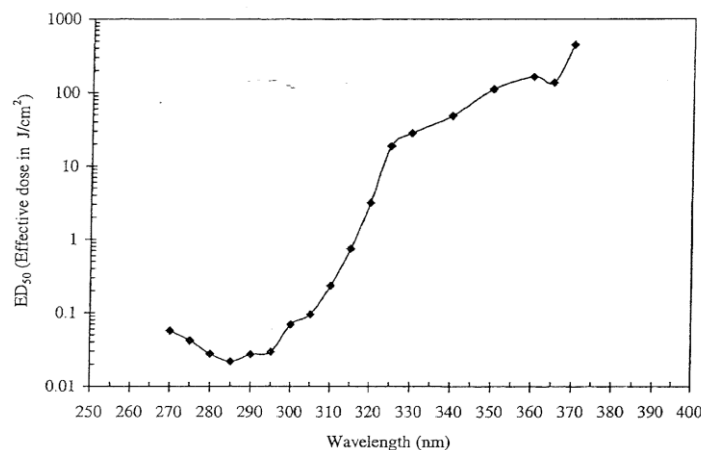


**Figura 6.-** Toxicidad de la radiación ultravioleta en el cristalino de la rata, en función de la edad. La toxicidad se cuantifica como la dosis máxima aceptable (MAD, del inglés) (Dong et al., 2003).

### 3.1.3. Estudios sobre los efectos de la radiación ultravioleta en el cristalino del cerdo

En la bibliografía existen escasos estudios sobre la influencia de la radiación UV sobre el ojo de cerdo. Tres de los más destacados son el realizado por Oriowo y sus colaboradores (Oriowo et al., 2001), en el que se establece el espectro de acción para una cataratogénesis aguda producida por radiación UV en un cultivo de células epiteliales de cristalino, el realizado por el mismo grupo de investigadores en el año 2002 (Oriowo et al., 2002), en el que estudiaron la fototoxicidad de la radiación UVA sola y combinada con UVB en lentes de cerdo cultivadas, y el realizado por Okuno y sus colaboradores (Okuno et al., 2012), en el que también determinan el espectro de acción UV que produce la muerte de la células epiteliales del cristalino del cerdo *in vitro*.

El espectro de acción de una respuesta biológica es la variación en magnitud de dicha respuesta en función de la longitud de onda. Oriowo *et al* (Oriowo et al., 2001), realizaron su estudio *in vitro*, utilizando un cultivo de cristalino de cerdo. Tras una semana de cultivo en un medio controlado, las células fueron expuestas a bandas espectrales de radiación comprendidas entre 270 y 370 nm, en intervalos de 5 y 10 nm. Como fuente de radiación UV utilizaron una lámpara de Xe de alta presión y 1000 W de potencia. La Dosis Media Efectiva ( $ED_{50}$ ), es decir, el umbral de energía UV que es capaz de producir alteración en al menos la mitad de muestras de cristalino para cada banda del espectro estudiada, fue determinada estadísticamente mediante cálculo de probabilidades. En promedio cinco cristalinos fueron irradiados para cada nivel de energía y cada banda del espectro. El área irradiada sobre los cultivos de cristalino fue  $3.06 \text{ mm}^2$  y se monitorizaron las opacidades producidas por UV cada 6 o 12 horas hasta las 48 horas después de la exposición a la radiación, mediante microscopio de disección y microfotografía. Los resultados indicaron que los valores umbrales para las longitudes de onda 270, 300 y 365 eran  $0.057$ ,  $0.069$  y  $137.19 \text{ J/cm}^2$  respectivamente. Para opacidades permanentes los valores umbrales fueron el doble, tanto para UVA como para UVB. Los tiempos de exposición variaban de 49 segundos a 22 horas. Las  $ED_{50}$  se representaron en función de las longitudes de onda para obtener el espectro de acción (Figura 7).

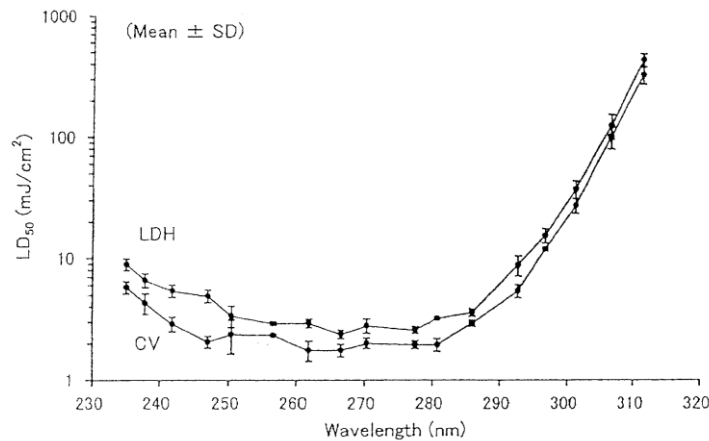


**Figura 7.-** Espectro de acción para una cataratogénesis aguda producida por radiación UV sobre un cultivo de cristalino de cerdo.  $ED_{50}$  (Dosis Media Efectiva), es decir, umbral de energía UV que produce daños en la mitad de las muestras del cultivo de cristalinos (Oriowo et al., 2001).

Este estudio pone de manifiesto que la radiación UV de longitudes de onda comprendidas entre 270 y 315 nm, producen daños en el cultivo de cristalino con exposiciones relativamente bajas de energía. Por el contrario, para longitudes de onda superiores a 325 nm es necesaria una exposición alta de energía para producir lesiones subcapsulares en el cristalino, como puede observarse en la figura 8. Estos datos muestran la diferencia que existe entre el efecto que produce la radiación UVA y UVB, siendo evidentemente mucho más dañina la UVB que la UVA (Oriowo et al., 2001).

En el otro estudio, Oriowo y sus colaboradores describen una disminución en la integridad celular y óptica de las lentes tras ser expuestas a una radiación UVA a  $86 \text{ J/cm}^2$ , mientras que con la mitad de dosis ( $43 \text{ J/cm}^2$ ) no encontraron cambios significativos. Por otro lado, lentes expuestas a  $15.63 \text{ J/cm}^2$  UVA y  $0.019 \text{ J/cm}^2$  UVB, presentaron efectos adversos significativos que además fueron irreversibles (Oriowo et al., 2002).

Okuno *et al* realizaron un estudio similar al determinar el espectro de acción de la radiación UV que produjo la muerte de las células epiteliales del cristalino del cerdo. Este espectro de acción pretendía establecer las bases para la evaluación del peligro de la aparición de cataratas debidas a la exposición a la radiación UV. Para ello, expusieron un cultivo células epiteliales del cristalino de cerdo a diferentes dosis de radiación UV para 17 diferentes longitudes de onda, del 235 al 311 nm. Dos días después de la exposición, el estado de las células era verificado midiendo la absorbancia a 570 nm; primero de las células teñidas con cristal de violeta, lo cual era proporcional a su supervivencia, y después de lactato deshidrogenasa (LDH) teñido con azul de nitrotetrazolio y liberado por las células muertas en el medio de cultivo. La dosis de exposición requerida para destruir el 50% de las células ( $LD_{50}$ ) era determinada por la relación dosis-efecto obtenida para cada longitud de onda y era usada para construir el correspondiente espectro de acción. La Figura 8 muestra este espectro de acción para los dos indicadores usados, tinción por cristal de violeta y de azul de nitrotetrazolio para LDH (Okuno et al., 2012).



**Figura 8.-** Espectro de acción correspondiente a la radiación UV que produce la muerte de las células epiteliales del cristalino del cerdo, construido a partir del  $LD_{50}$  (exposición requerida para la muerte del 50% de las células) proporcionado por la tinción por cristal de violeta (CV) y por la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) (Okuno et al., 2012).

Este espectro de acción muestra una zona amplia de valores bajos de radiación que se extiende en el intervalo de 250-280 nm, indicando que la radiación UV es más peligrosa para las células epiteliales del cristalino del cerdo en ese rango de longitudes de onda, puesto que con poca energía son capaces de dañar al menos al 50% de la muestra. La Figura 8 muestra también que el espectro sube a ambos lados del intervalo de longitudes de onda descrito. Este comportamiento es consistente, como se ha visto anteriormente en esta introducción teórica, con los resultados encontrados en el espectro de acción determinado por la exposición a la radiación UV del ojo del conejo *in vivo*.

Los trabajos que acabamos de describir son importantes para el estudio de la cataratogénesis, pues analizan con claridad el efecto que determinadas longitudes de onda del espectro ultravioleta produce en cultivos de cristalinos de cerdo. El estudio de Oriowo *et al* (Oriowo et al., 2001), utiliza longitudes de onda que abarcan de 270-315 nm, y el de Okuno *et al* (2012) de 230-315 nm (Okuno et al., 2012).

Sin embargo, como hemos visto anteriormente, a la superficie de la tierra no llegan radiaciones por debajo de los 300 nm procedentes del sol y tampoco las fuentes artificiales de luz emiten por debajo de los 400 nm, es decir ni siquiera emiten UVA. Por lo tanto, las opacidades que puedan aparecer de forma natural por acción de la radiación ultravioleta siempre serán debidas a longitudes de onda superiores a 300 nm con luz solar. Esto pone de manifiesto que los estudios anteriores no utilizan la radiación real que se encuentra en la naturaleza salvo el intervalo de 300-315 nm.

### **3.1.4. Efectos de la radiación ultravioleta sobre el cristalino humano. Conocimientos actuales.**

Nuestro trabajo pretende aportar conocimiento sobre cómo influye la radiación UV presente en la luz solar en la formación de cataratas en el cristalino del cerdo, como mamífero con grandes similitudes con la especie humana. La formación de cataratas en el cerdo doméstico no tiene por el momento, un interés clínico inmediato ya que el cerdo doméstico no suele alcanzar una edad avanzada, y una gran parte de las cataratas se asocian al paso del tiempo. No ocurre lo mismo con los humanos, ya que el envejecimiento de la población y la consiguiente proliferación de los diferentes tipos y grados de cataratas, hacen que su estudio sea de una importancia clínica evidente (Artigas et al., 2012b). Por esta razón, se han realizado algunos estudios epidemiológicos sobre la acción de la radiación UV sobre el cristalino humano.

Actualmente se utiliza cada vez con más frecuencia el cristalino del cerdo como modelo para estudiar diferentes aspectos del ojo humano debido a sus semejanzas filogenéticas (Kivell et al., 2009; Middleton, 2010). El estudio del ojo del cerdo permitiría en principio la extrapolación de resultados al caso humano, aunque siempre con las debidas reservas. En esta sección vamos a exponer los conocimientos que tenemos en la actualidad sobre el efecto de la radiación UV en el ojo humano.

El estudio del efecto de la radiación UV sobre el ojo humano en general y el cristalino en particular, es difícil y complicado. El hecho obvio de no poder someter a un sujeto a una cantidad de radiación UV controlada durante un tiempo para conocer sus efectos, ya es una dificultad insalvable. En cualquier caso, es evidente que este estudio no se puede llevar a cabo de una manera directa. Entonces, ¿cómo se puede hacer una aproximación a este problema? La única forma es hacer estudios epidemiológicos, eligiendo cuidadosamente la población. Por ejemplo eligiendo un grupo suficientemente extenso personas que por su trabajo están expuestos muchas horas diarias al sol, y comparar los resultados con otro grupo que no esté sometido a tanta exposición solar. En cualquier caso, el análisis de los resultados hay que hacerlo con precaución.

Diferentes estudios epidemiológicos abordan esta cuestión (Cruickshanks et al., 1992; Dolin, 1994; Hiller et al., 1977; McCarty et al., 2000; Sasaki et al., 2003; Taylor et al., 1988; West, 1999). Uno de los más significativos es el *Chesapeake Bay Study* (Taylor et al., 1988), un estudio transversal sobre pescadores en el que se desarrolló un elaborado

modelo para cuantificar la exposición ocular a la radiación UVB. (Rosenthal et al., 1988, 1986) El cuestionario elaborado informaba de la exposición a la radiación UVB tanto en el trabajo como en el tiempo de ocio de personas con edades que iban de los quince años en adelante. También incluía datos sobre si se usaba sombrero y gafas de sol, combinando esta información con medidas de campo sobre el flujo de radiación UVB, estimando a partir de estos datos la exposición acumulada y la exposición media anual. Los resultados mostraron que las personas que estaban incluidas en el primer cuartil de exposición, tenían 3.3 veces más probabilidades de desarrollar cataratas corticales que aquellos que estaban incluidos en el último cuartil. El *Chesapeake Bay Study* ha sido pues el único trabajo que ha establecido una relación dosis-respuesta entre la radiación UVB y las cataratas corticales. Lógicamente, el riesgo de desarrollar cataratas corticales aumenta con el incremento del nivel medio de exposición anual de radiación UVB. En conclusión, este estudio pone de manifiesto la relación entre la exposición acumulada a la radiación UVB y las opacidades corticales.

Otro estudio transversal fue el *Beaver Dam Eye Study* (Cruickshanks et al., 1992), realizado sobre una población adulta de una comunidad de Wisconsin. En este caso la exposición a la radiación UVB fue obtenida a partir de un cuestionario similar al trabajo anteriormente descrito. Lo curioso de este estudio reside en que se encontró una relación entre la exposición a la radiación UVB y las cataratas corticales en los hombres, pero no en las mujeres. Este resultado lo explican los autores diciendo que puede ser que las mujeres estuvieran en general menos expuestas a la radiación solar por su tipo de trabajo.

El estudio de McCarty y colaboradores se basó en una población de personas entre 40 y 98 años tanto de medio urbano como rural en la ciudad de Victoria (Australia). Se evaluaron múltiples causas de cataratas, como la edad, el sexo, la diabetes, el entorno en el que vivían (por su mayor o menor exposición a los rayos UV), el hábito de fumar y alteraciones oculares que influyen en la formación de cataratas como la maculopatía y la miopía. Una de sus conclusiones fue que de los factores modificables que pueden producir cataratas corticales, la exposición a la radiación UVB explica un 10% de las cataratas estudiadas (McCarty et al., 2000).

Otros estudios que intentan relacionar la radiación UV con la formación de cataratas están basados en pacientes que acuden a centros clínicos, donde se les somete a un cuestionario sobre el tipo de ocupación, horas que pasan al sol, etc, siendo entonces los resultados cualitativos. El *Italian Study* encuentra una asociación entre cataratas corticales y ocupaciones al aire libre; mientras que el *Massachusetts Study* no encuentra esa relación

(Italian-american group, 1991; Leske et al., 1991). Por otra parte, Sasaki y sus colaboradores encuentran que la mayor prevalencia de catarata cortical era en el cuadrante nasal inferior, y que dicha prevalencia era más acusada en individuos que vivían en latitudes bajas (Sasaki et al., 2003).

Existen otros estudios que intentan relacionar la exposición a la radiación UVB y la formación de cataratas subcapsulares. El *Maryland Study* (Bochow et al., 1989) es un estudio clínico basado en casos-control en el que se controlaron los casos de personas con cataratas subcapsulares con métodos similares a los del *Chesapeake Bay Study*, es decir, estimando en cada caso el tiempo de exposición e intensidad de radiación UVB a la que estaba expuesto el sujeto. Éstos se compararon con sujetos que no tenían historia clínica referente a cataratas subcapsulares. Los resultados revelaron que no existe una relación directa entre la exposición a la radiación UVB y la formación de cataratas subcapsulares. En el *Chesapeake Bay Study* no se analizaron estos casos por constituir sólo un 2% de la población estudiada. En el *Beaver Dam Study*, el 6% de la población estudiada correspondía a personas con catarata subcapsular, pero no se encontró ninguna relación significativa entre esta afección y la exposición a la radiación UVB. Solamente en el *Maryland Study* puede demostrarse que existe una relación entre la exposición a la radiación UVB y la formación de cataratas subcapsulares. Los restantes estudios (Italian Study y Massachusetts Study) proporcionan sólo una pequeña evidencia de esta relación.

Como resumen general, se puede decir que a partir de estos estudios sólo existe una limitada evidencia de que la exposición al UVB solar, causa cataratas corticales y subcapsulares en humanos. En cualquier caso es difícil precisar qué efectos concretos produce la radiación UV en el ojo humano, pero lo que sí parece claro es que al ser la radiación solar más energética que llega a la superficie de la tierra, ha sido probado que tiene algún efecto dañino en los seres vivos y particularmente en el ojo. (Pitts, 1990; Rosenthal et al., 1988; Taylor et al., 1988) Debido a esto, la *World Health Organization* (WHO), la *World Meteorological Organization* (WMO), la *United Nations Environment Programme* (UNEP), y la *International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection* (ICNIRP) definen el Índice Global de Ultravioleta Solar de la siguiente manera: “*The Global Solar UV Index (UVI) describes the level of solar UV radiation at the Earth’s surface. The values of the index range from zero upward – the higher the index value, the greater the potential damage to the skin and eye, and the less time it takes for harm to occur*” (El índice global de UV solar describe el nivel de radiación UV solar en la superficie terrestre. El valor de este índice va de cero en aumento, y cuanto más alto es el valor del índice, existe un mayor daño potencial para la piel y el ojo, y es menor el tiempo que se necesita para



producir dicho daño). Esta definición indica la preocupación de la Organización Mundial de la Salud sobre los efectos que la radiación UV puede producir en el ojo.

El *Global Solar UV Index* (UVI) se formula usando la referencia definida por la *Commission on Illumination* (CIE) para el espectro de acción para la radiación UV que induce eritemas en la piel humana (ISO 17166:1999/CIE S 007/E-1998). Esta medida de la radiación UV está definida para una superficie horizontal. El índice UVI es una cantidad adimensional y viene definida por la fórmula:

$$I_{UV} = k_{er} \int_{250nm}^{400nm} E_{\lambda} s_{er}(\lambda) d\lambda$$

Donde  $E_{\lambda}$  es la irradiancia espectral expresada en  $W/(m^2nm)$  para la longitud de onda  $\lambda$  y  $d\lambda$  es el intervalo de longitudes de onda usada en el sumatorio.  $S_{er}(\lambda)$  es el espectro de acción de referencia del eritema y  $k_{er}$  es una constante igual a  $40 m^2/W$ .

## 3.2. ANATOMÍA Y FISIOLÓGÍA DEL CRISTALINO

### 3.2.1. Anatomía macroscópica y microscópica

El cristalino es una estructura completamente transparente, fundamental desde el punto de vista óptico para la refracción ocular y que interviene activamente en la agudeza visual. Es una lente biconvexa en la mayoría de los animales, modificándose dicha convexidad durante el proceso de acomodación, lo que permite enfocar los rayos provenientes de objetos a diferentes distancias. La transparencia está determinada por diversos factores como la estricta ordenación de sus fibras, la solubilidad de sus proteínas y la baja densidad citoplasmática de sus células (Davidson and Nelms, 2007). Otra característica relevante es que su crecimiento es continuo durante toda la vida del animal.

Al igual que la córnea, es una estructura que carece de aporte directo sanguíneo así como de inervación. Por ello, para su nutrición y para la eliminación de productos metabólicos el cristalino depende del humor acuoso (Samuelson, 2007).

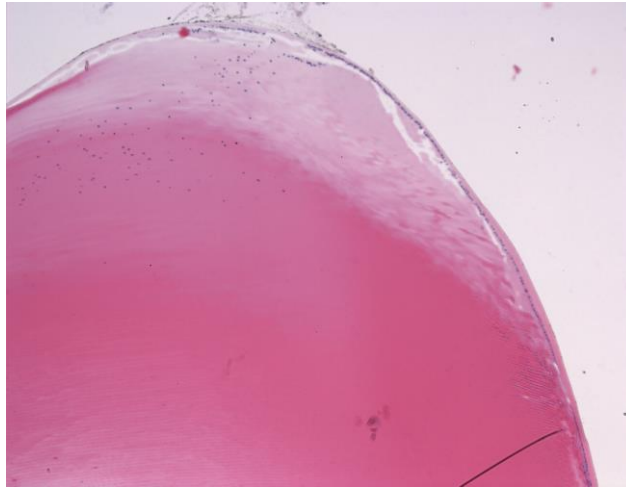
El poder dióptrico del cristalino es variable dependiendo de las especies. De aproximadamente 60 dioptrías totales, la lente contribuye en 13-16 dioptrías en humanos, frente a 40 dioptrías en el cerdo o en el perro (Gum et al., 2007).

La anatomía microscópica del cristalino es relativamente sencilla, e incluye un sistema de ligamentos zonulares, la cápsula con una membrana basal, un epitelio y las fibras lenticulares (Davidson and Nelms, 2007) (Figuras 9 y 10).

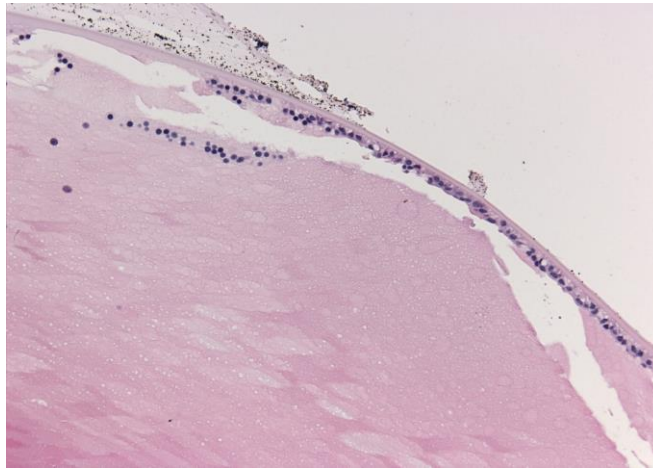
La **cápsula** es una membrana elástica compuesta mayormente por fibras de colágeno tipo IV, cuyo grosor varía dependiendo de la región. En realidad, se trata de una membrana semipermeable que evita el paso de grandes moléculas hacia el interior de la lente, y que en se corresponde con la membrana basal secretada por las células del epitelio. Tiene una importante función mecánica, interviniendo en el proceso de acomodación y en la sujeción de toda la estructura en las fibras zonulares.

El **epitelio** del cristalino es una capa de células aplanadas situada en la cara anterior del mismo. Se denomina zona germinativa al grupo celular situado en la zona más ecuatorial, que sufre mitosis de manera más frecuente. Las células son cuboides al inicio, y columnares cerca del ecuador, alargándose y adoptando la forma de fibras hexagonales delgadas. Sobre esta estructura recae la mayor producción de energía en la lente, que se utiliza para el transporte activo de iones inorgánicos y aminoácidos, así como para la síntesis de proteínas.

Las **fibras cristaliniánas** se originan a partir de la zona germinativa. Con el tiempo van alargándose, con una dirección anteroposterior. Estas fibras lenticulares se curvan desde la superficie anterior a la posterior, uniéndose en unos puntos de inserción con forma de “Y” (sutura anterior), mientras que las inserciones posteriores delimitan una “Y” invertida (sutura posterior). Las fibras se organizan en unidades que poseen interdigitaciones a manera de un puzle tridimensional; estas interdigitaciones son uniones gap especializadas que unen las células lenticulares a manera de un gran sincitio. Se forman durante toda la vida del animal, siendo las más periféricas las más jóvenes, que constituyen la corteza del cristalino. Las fibras de la zona central pierden el núcleo celular y las organelas citoplásmicas y conforman el núcleo del cristalino. El cristalino se une al cuerpo ciliar mediante los **ligamentos zonulares**, que se insertan a nivel del ecuador en dos planos (anterior y posterior).



**Figura 9.-** Corte de un cristalino donde se observan las diferentes estructuras.



**Figura 10.-** Fotomicrografía de la zona germinativa del cristalino (cerca de su ecuador), que permite ver el proceso activo de formación de las fibras del cristalino desde el epitelio subcapsular. Puede observarse la cápsula gruesa (a) y la capa subyacente de fibras del cristalino nucleadas durante su diferenciación (b). Las fibras del cristalino maduras carecen de núcleo como puede observarse (c). Imagen tomada a 200x.

### 3.2.2. Composición química del cristalino

El cristalino es uno de los tejidos del cuerpo humano con menos proporción de agua en su composición (66%); asimismo, está compuesto por proteínas (35%) y pequeñas cantidades de lípidos, iones inorgánicos, carbohidratos, ácido ascórbico, glutatión y aminoácidos (Gum et al., 2007).

## **Proteínas**

La mayor parte de las proteínas del cristalino son solubles (90-95%) y se sintetizan fundamentalmente en el epitelio y en las fibras más periféricas. Se trata de proteínas termodinámicamente estables y organizadas de tal modo que permiten que el cristalino sea un medio transparente. (Delaye and Tardieu, 1983) Se designan atendiendo a su tamaño molecular en  $\alpha$  (35%),  $\beta$  (55%) y  $\gamma$  cristalinas (1-2%). (de Jong and Hendriks, 1986) El resto de proteínas (insolubles) forman parte de membranas, el citoesqueleto o de agregación entre las proteínas cristalinas. La proporción de proteínas varía con la edad, la especie y el estado fisiopatológico de la lente; por ejemplo, cuando existe una catarata aumenta el nivel de proteínas insolubles.

Las proteínas son específicas de órgano, desde el punto de vista inmunológico, aunque no son especie-específicas. La cápsula del cristalino evita que las proteínas lenticulares contacten los sistemas retículo-endotelial y circulatorio desde el estado prenatal, de tal manera que si posteriormente tienen contacto con el humor acuoso, el sistema inmunitario las reconoce como extrañas. El resultado es la producción de anticuerpos y el desarrollo de una uveítis inmunomediada, en la que juegan un papel fundamental células como los linfocitos y neutrófilos (Gum et al., 2007).

## **Carbohidratos**

La glucosa es la fuente energética fundamental del cristalino, al que llega a través del humor acuoso. Penetra mediante un sistema de transporte pasivo facilitado e insulino-dependiente (Okuda et al., 1987). Los carbohidratos son necesarios para la síntesis de los componentes estructurales de la lente y el transporte activo de material a través de las membranas celulares. Los metabolitos necesarios para el funcionamiento normal de la lente atraviesan la cápsula hacia el epitelio, que es el área con mayor ritmo metabólico.

La glucólisis anaerobia proporciona dos terceras partes de la energía, siendo la hexoquinasa la principal enzima implicada, mientras que el metabolismo aeróbico (ciclo de Krebs), que no ocurre en las fibras cristalinas por carecer de mitocondrias, proporciona el resto. Parte de la glucosa se degrada por la vía de las pentosas-fosfato. Además, hace más de cuarenta años se describió la vía del sorbitol en el cristalino (Van Heyningen, 1959), aunque la función de esta vía metabólica no está del todo clara actualmente.

## Lípidos

Se encuentran sobre todo en las membranas celulares, siendo el 50-60% colesterol. El alto contenido en esfingomielina, colesterol y ácidos grasos saturados en las membranas celulares de las fibras cristalinas hace que éstas sean rígidas (Alcala et al., 1988).

## Otros solutos

El ácido ascórbico y glutatión están presentes en altos niveles en el cristalino, aunque esto depende de la especie; así por ejemplo en el perro, conejo y Guinea Pig los niveles de ácido ascórbico son menores que los encontrados en el humor acuoso. La función del ácido ascórbico lenticular se relaciona con reacciones de oxidación-reducción y con el metabolismo del glutatión. El glutatión es el péptido más abundante a nivel celular; sus niveles son altos en la lente y se encarga por una parte de preservar el equilibrio de las proteínas lenticulares manteniendo altos niveles de grupos sulfidrilo (SH-) y manteniendo las bombas de transporte (Na/K-ATPasa) y la integridad de las membranas de las fibras de la lente.

El equilibrio hidroelectrolítico es crítico para la transparencia de la lente. La mayor parte del agua asociada a las proteínas no puede difundirse de forma libre. Sodio, potasio y cloro difunden de forma libre a través de la cápsula, y su contenido es controlado por bombas enzimáticas (sobre todo la de sodio), que se encuentran en las células del epitelio anterior (Gum et al., 2007).

### 3.2.3. Fotometría ocular

La absorción de la radiación por los diferentes medios oculares nos interesa a la hora de plantear si existe una gran diferencia entre realizar un estudio in vivo con el globo ocular intacto o in vitro utilizando únicamente el cristalino. La córnea absorbe esencialmente toda la radiación de longitud de onda inferior a 290 nm en la región UV, transmite el resto de ultravioleta y toda la radiación visible y es un filtro importante de IR. El humor acuoso absorbe sólo un 20% del UV, una parte despreciable de la luz visible y una absorción significativa de IR por encima del 50%. El cristalino es el principal responsable de las pérdidas de luz por absorción en el espectro visible. Su absorción es más importante en la

región del azul que en el amarillo y esto varía con la edad. En la radiación UV absorbe entre 300 y 400 nm, y es el filtro que evita que el UVA llegue a la retina. En la región del IR, el cristalino transmite casi toda la radiación. El humor vítreo es transparente a toda la radiación y presenta únicamente una pequeña barrera de absorción en el infrarrojo (Artigas et al., 1995).

La transmisión es la cantidad de luz, medida en rango de longitudes de onda del espectro visible, que deja pasar un medio ocular. El rango de dichas longitudes de onda que un animal percibe, depende del espectro que existe en el entorno que le rodea, el grado en el que dicho espectro se transmite a través de los medios oculares y por último, de los pigmentos visuales de la retina. La transmisión de los medios oculares (córnea, lente, humor acuoso y vítreo) viene determinado por sus componentes estructurales, grosor, y en algunos casos, de pigmentos que absorben las longitudes de onda corta y que sólo tienen unos pocos animales como algunos roedores, marsupiales y murciélagos (Douglas and Jeffery, 2014). La transmisión de la lente es muy variable; en algunas especies, la lente deja pasar hasta los 300 nm, filtrando gran parte de la radiación UV, mientras que otros pueden filtrar todo el espectro UV y parte del azul. (Douglas and Jeffery, 2014) La lente del conejo y del cerdo pueden absorber y dispersar la mayoría de la radiación UV, porque los valores de transmisión para longitudes de onda menores de 410 nm se reducen notablemente (Tsukahara et al., 2014). Las especies que se consideran nocturnas, poseen lentes que transmiten los rayos UV, mientras que las diurnas, protegen a la retina de dicha radiación filtrándola (Tsukahara et al., 2014).

En el caso humano, si la lente, que absorbe la mayoría de la radiación UV que llega al ojo, se extrae por cirugía de cataratas o daño traumático y no se reemplaza por una lente intraocular, los pacientes informan de una vívida y detallada visión UV (Stark et al., 1994).

#### **3.2.4. Propiedades ópticas del cristalino del cerdo**

El cristalino del cerdo tiene al igual que del humano, una pronunciada curvatura posterior. El espesor de la cápsula varía entre 5 y 30 mm. (Middleton, 2010) Vilupuru & Glaser realizaron un exhaustivo trabajo relacionando los parámetros ópticos y biométricos del cristalino del cerdo in vitro, para lo cual analizaron 20 cristalinos de cerdo aislados. Sus resultados, en lo que respecta a los parámetros ópticos y biométricos, se resumen en la Figura 4, como consecuencia de analizar los datos obtenidos con un láser scanner. Los

puntos de intersección de los rayos de entrada y salida son los puntos principales (Figura 11a). El eje óptico se define por el rayo que a través de la lente no se desvía. La longitud focal total media se calculaba como el promedio de la distancia de todos los rayos de salida refractados, entre sus puntos principales y sus puntos de intersección con el eje óptico (Figura 11a). Todas las longitudes focales medidas eran hechas con referencia a la longitud de onda de 633 nm. La potencia dióptrica (F) estimada del cristalino se obtenía a partir de la longitud focal (f) y del índice de refracción salino ( $n=1.3333$ ), de acuerdo con la expresión  $F=(n \times 1000)/f$  (Vilupuru and Glasser, 2001).

Estos autores calcularon la aberración esférica de los cristalinos ajustando los correspondientes polinomios de segundo orden o más altos (Figura 11b). Estos polinomios describen los cambios en la distancia focal de cada rayo de salida como una función del diámetro total del cristalino. La Figura 11c muestra la imagen del perfil del cristalino obtenido a partir de las medidas del scanner láser. A continuación se aplicaba una calibración para determinar las medidas de las caras anterior y posterior del cristalino (Figura 11d) (Vilupuru and Glasser, 2001).

De acuerdo con todos los datos obtenidos, Vilupuru & Glaser desarrollan un modelo de ojo de cerdo cuyos parámetros más importantes se muestran en la Figura 5. Los cristalinos eran obtenidos de cerdos de entre 3 y 8 años, por lo que debido a que el cristalino sigue creciendo a lo largo de la vida, el peso de los cristalinos estudiados variaba entre 0.55 g y 1.08 g. Finalmente, de acuerdo con el índice de refracción y la distancia focal determinada en el modelo de ojo de cerdo mostrado en la Figura 12, la potencia del cristalino del cerdo es de alrededor de 58 dioptrías.

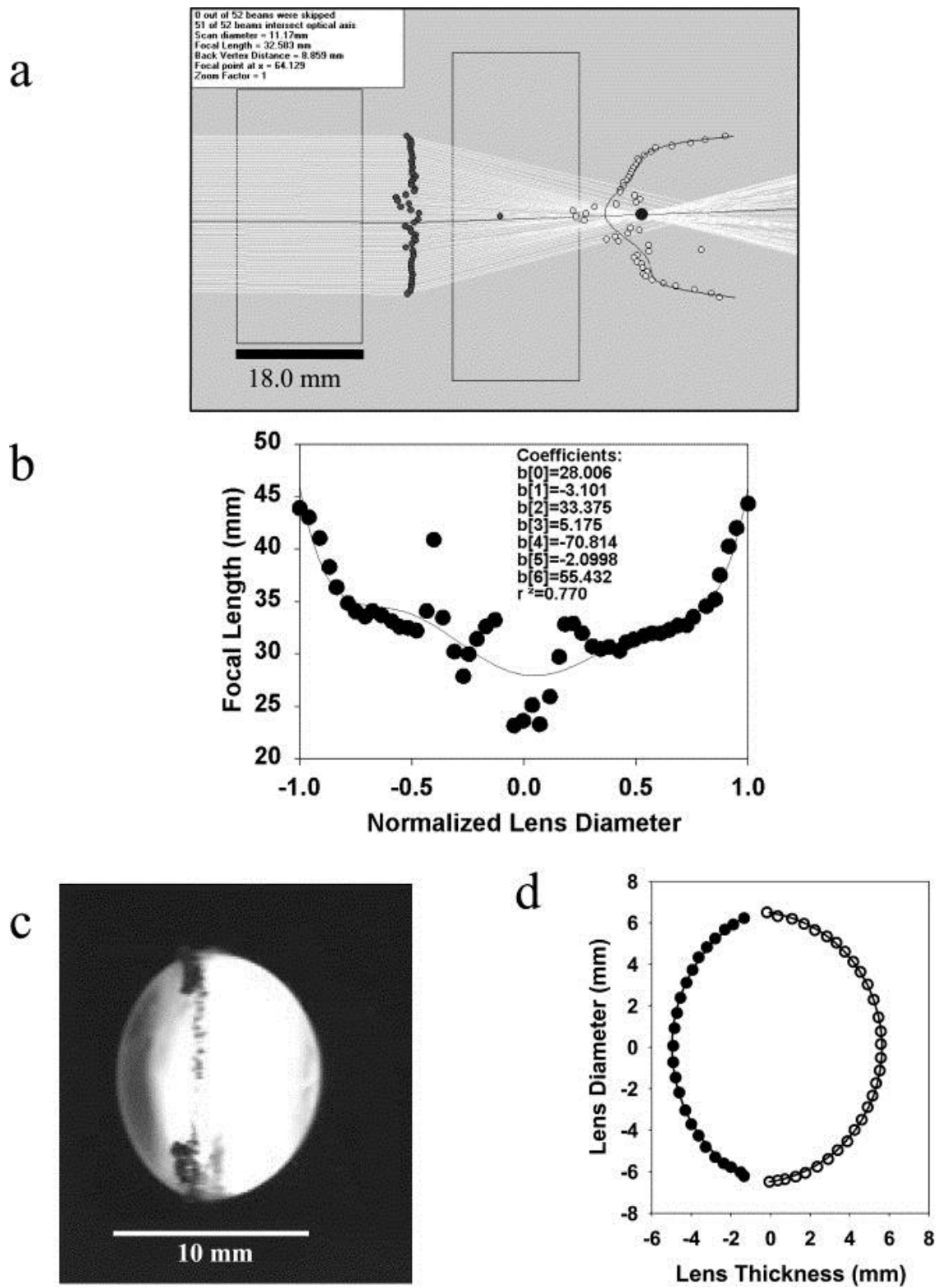
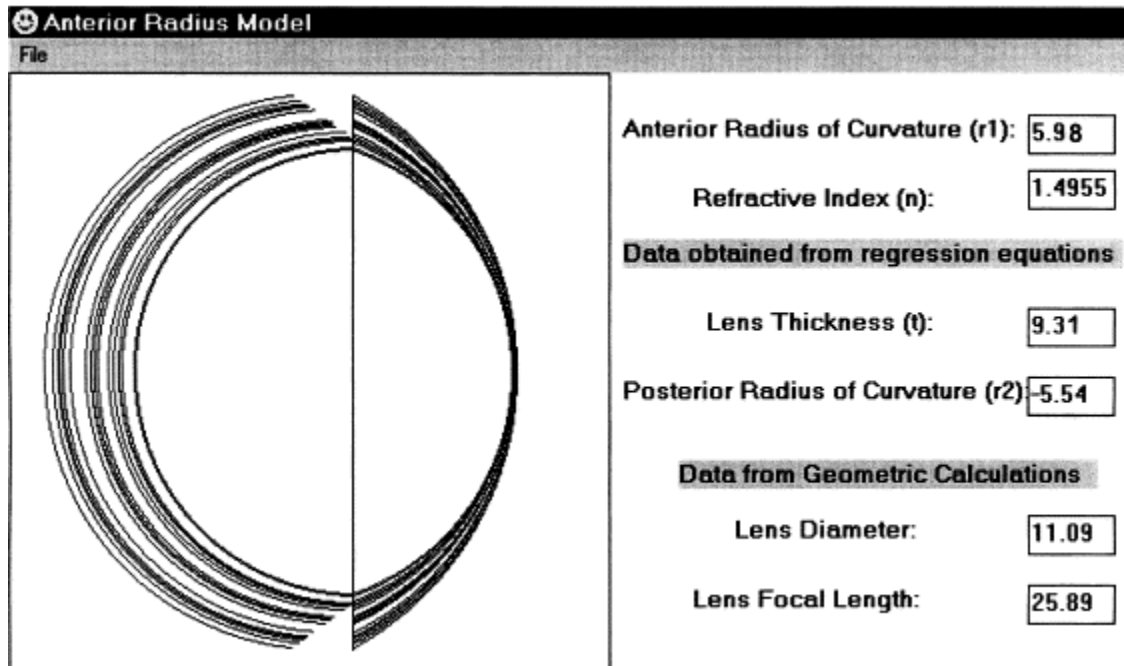


Figura 11.- Parámetros ópticos y biométricos del cristalino del cerdo (Vilupuru and Glasser, 2001).





**Figura 12.-** Principales parámetros ópticos y biométricos del cristalino del cerdo doméstico (Vilupuru and Glasser, 2001).

### 3.3. MECANISMOS IMPLICADOS EN LA FORMACIÓN DE CATARATAS

A pesar de su relativamente sencilla anatomía, en el cristalino se producen procesos químicos muy refinados que funcionan a lo largo de la vida del animal para mantener su transparencia. La pérdida de la claridad es un denominador común en cualquier alteración de la lente (Davidson and Nelms, 2007).

La catarata se define como una opacidad no fisiológica del cristalino. En el momento en el que la opacidad se evidencia clínicamente, se presuponen alteraciones metabólicas irreversibles relacionadas con el contenido proteico, las bombas metabólicas, las concentraciones de iones y la actividad antioxidante. Los cambios estructurales anatómicos se caracterizan por la agregación de proteínas, la hidratación tisular, la separación de componentes moleculares, la rotura de membranas celulares y cambios en la estructura del citoesqueleto (Davidson and Nelms, 2007).

Existen numerosas clasificaciones para las cataratas en la literatura, realizadas en base a la etiología (debida a numerosas causas específicas), tiempo de aparición de la opacidad (congénitas, juveniles, seniles...), localización anatómica (capsular, subcapsular,

zonular, cortical, nuclear, axial, ecuatorial), apariencia (puntiforme, estrellada...) o estado de progresión (incipiente, inmadura, madura e hipermadura). La mayoría de estas clasificaciones no se relacionan específicamente con una etiología concreta. En medicina veterinaria, el estado de progresión es quizá la clasificación más aceptada a nivel clínico, a través de la exploración biomicroscópica del globo ocular (Davidson and Nelms, 2007).

En medicina humana, el estrés oxidativo se considera el principal factor implicado en la formación de cataratas, estando además involucrado en la patogénesis de otras enfermedades oculares, como el glaucoma o las retinopatías. Es sabido desde hace mucho tiempo que la incidencia de cataratas es superior en países con índice UV elevado; ya en los años 70 se sugirió que la penetración de la radiación UV al interior del globo ocular producía la fotooxidación de proteínas, con la generación de radicales superóxido, radicales hidroxilo y oxígeno libre en el humor acuoso y la lente; de hecho, algunos autores describieron una concentración entre 5 y 10 veces mayor de peróxido de hidrógeno en el humor acuoso de pacientes humanos con cataratas en relación a personas con cristalinos sanos (Lerman and Borkman, 1976; Pirie, 1971).

El daño oxidativo altera la estructura e integridad de las células de la lente, con pérdida de solubilidad de las proteínas y disminución de las adhesiones entre las células. Para mantener su transparencia, el cristalino posee eficaces mecanismos antioxidantes; es sabido que la deficiencia de cualquiera de estos mecanismos protectores resultará en cambios de la transparencia de la lente. Sin embargo, con el envejecimiento, las sustancias con potencial oxidativo superan las defensas antioxidantes desarrollando diversas patologías entre las que se encuentran la aparición de opacidades del cristalino (Umapathy et al., 2013).

La principal función del cristalino es enfocar la luz a la retina. Para ello, está formado por fibras cristalinas estrictamente ordenadas que se derivan de células epiteliales ecuatoriales y que sufren un proceso de diferenciación que incluye la elongación de las fibras, la pérdida de organelas celulares y núcleos y la expresión de proteínas específicas. Como el cristalino posee crecimiento continuo, se establece un gradiente de células en diferentes estados de diferenciación alrededor de un núcleo de células maduras y anucleadas (Donaldson and Lim, 2008).

Diversos estudios han demostrado que la apoptosis de las células epiteliales del cristalino juega un papel relevante en el proceso de cataratogénesis (Zhang et al., 2011). Las proteínas  $\alpha$  cristalinas son las más abundantes en la lente, actuando como chaperonas

moleculares y previniendo la agregación de proteínas estructurales; esta función es esencial a la hora de mantener la transparencia de la lente a lo largo de los años; de hecho, la disminución de la función chaperona de la proteína  $\alpha$  cristalina puede ser la razón de las cataratas seniles en humanos (Derham and Harding, 1997). Asimismo, recientes estudios muestran que posee propiedades anti-apoptosis inducida por varios agentes, entre los que se encuentran la luz UV, la estaurosporina, el Factor de necrosis tumoral, el peróxido de hidrógeno y el etopósido (Andley et al., 2000; Mao et al., 2004; Mehlen et al., 1996). Los mecanismos moleculares de esta propiedad anti-apoptosis no son bien conocidos, aunque se ha descrito que bloquea moléculas proapoptóticas, suprime la maduración de la procaspasa e inhibe la liberación del citocromo (Pasupuleti et al., 2010).

Nahomi y sus colaboradores (Nahomi et al., 2013) incluso sugieren que los péptidos de las proteínas  $\alpha$ -cristalinas pueden incluso ser utilizados como agentes terapéuticos para tratar cataratas y otras enfermedades en las que la apoptosis y la agregación de proteínas son factores importantes. Por su parte, Sreekumar y sus colaboradores (Sreekumar et al., 2013) encuentran que los péptidos derivados de proteínas  $\alpha$  y  $\beta$  cristalinas muestran propiedades chaperonas y antiapoptóticas, protegiendo el epitelio pigmentario de la retina de la muerte celular, e inhibiendo la activación de caspasa 3.

Al ser el cristalino una estructura completamente avascular, algunos autores sugieren la presencia de un sistema especializado de microcirculación que funciona para introducir nutrientes y antioxidantes a la lente y eliminar las sustancias de deshecho (Candia et al., 2012; Donaldson et al., 2001). Estos autores postulan que hay componentes ionizados que son capaces de introducirse en la lente a través de los espacios extracelulares, de tal manera que la alteración de este sistema circulatorio interviene en la formación de cataratas.

El humor acuoso humano posee pequeñas cantidades de ácido ascórbico y glutatión, dos sustancias con conocida actividad antioxidante en tejidos como la córnea y la lente (Riley et al., 1980; Ringvold et al., 2000). Así, las altas concentraciones de ácido ascórbico en el humor acuoso previenen la penetración de la radiación UV y por lo tanto protegen a los tejidos intraoculares del daño oxidativo fotoinducido (Ringvold, 1996). Asimismo, el ácido ascórbico es un componente esencial para la síntesis de colágeno y posee propiedades antiinflamatorias.

Por su parte, el glutatión es un antioxidante de gran potencia que tiene múltiples funciones a nivel ocular. Puede ser obtenido de la dieta, o sintetizado a partir de los

aminoácidos cisteína, glutamato y glicina, a través de la  $\alpha$ - glutamilsintetasa. Protege los grupos tioles de las proteínas; además es mediador del paso de dehidroascorbato a ácido ascórbico, incrementando la capacidad antioxidante del ojo. Los niveles de glutatión se mantienen mediante un ciclo de oxidación- reducción que necesita la acción de dos enzimas: la glutatión peroxidasa y glutatión reductasa (Umapathy et al., 2013).

Numerosos investigadores centran su esfuerzo en desarrollar el uso preventivo de antioxidantes naturales y fármacos que actúan sobre el metabolismo de la lente para retrasar el desarrollo de opacidades, aunque sus resultados son controvertidos; sin embargo, sólo unos pocos han centrado su trabajo en los procesos moleculares de acumulación de estos productos (Chiu and Taylor, 2007; Umapathy et al., 2013; Varma et al., 2011).

### **3.4. REGENERACIÓN DEL CRISTALINO**

La regeneración espontánea del cristalino fue demostrada inicialmente por Cocteau y Leroyd'Etoile en 1825, en conejos albinos de raza New Zealand. Se descubrió enseguida que la regeneración requiere la presencia de la cápsula y el epitelio; más específicamente, para que el proceso de regeneración sea exitoso, necesita una cápsula anterior y posterior intacta, sobre todo la parte ecuatorial, así como la ausencia de adherencias entre cápsulas. La inmensa mayoría de los trabajos sobre regeneración se han realizado en el conejo, aunque también se ha trabajado con especies como el perro, gato, oveja, cobayas, ratas y primates (Gwon, 2006).

Está extensamente descrito que la regeneración es más rápida y completa en animales jóvenes; el papel de la inflamación sobre el proceso regenerativo es controvertido; así, aunque se sabe que la presencia de inflamación intensa o panoftalmitis lo dificulta, se ha comprobado que los mediadores químicos en un proceso inflamatorio leve pueden estimular el proceso regenerativo.

El primer paso para la regeneración es la diferenciación de las células epiteliales en fibras, de una manera similar a la producida durante el desarrollo embrionario de la lente. Durante el desarrollo, las células epiteliales proliferan en toda la cápsula anterior y posterior, y posteriormente se produce una elongación de las células epiteliales posteriores, migración

anterior y pérdida de núcleos, diferenciándose en fibras lenticulares en el ecuador. Las fibras forman el núcleo fetal, que se va compactando conforme se produce la diferenciación en la zona ecuatorial. En la regeneración de la lente, se observa proliferación y migración celular en la cápsula anterior y posterior durante los primeros días, seguido de una elongación de las células epiteliales posteriores y la migración anterior de células. Sin embargo, se sabe que en proceso regenerativo no existe un alineamiento regular de las fibras, debido a que el ritmo de proliferación y diferenciación es distinto dependiendo de la zona del saco capsular.

La expresión alterada de factores implicados en la diferenciación de las fibras cristalinas son los responsables de patrones de crecimiento anormales de las lentes regeneradas. En particular, se ha demostrado que la composición proteica del cristalino normal y regenerado en conejos es muy similar en cuanto a las proteínas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  (Gwon et al., 1993, 1989). Es difícil establecer el poder dióptrico de las lentes regeneradas, debido a sus alteraciones estructurales y la presencia de opacidades.

La regeneración completa del cristalino humano a día de hoy no ha podido ser demostrada, aunque existe una amplia evidencia de que el epitelio tiene capacidad de proliferación y diferenciación. De hecho, la proliferación contribuye a la formación de cataratas secundarias en la cara posterior de las lentes intraoculares, tras la cirugía de extracción extracapsular del cristalino. En cambio, ha sido demostrada en primates no humanos; se sabe que la rapidez de la regeneración depende de la especie, siendo por ejemplo mucho más lenta en monos que en conejos.

### **3.5. EL OJO PORCINO COMO MODELO ANIMAL**

La investigación con modelos animales han permitido mejorar el conocimiento de numerosas enfermedades oculares en personas. El ojo del cerdo se ha consolidado como un modelo muy similar al humano, tanto a nivel anatómico como histológico y fisiológico (Bertschinger et al., 2008; Chu et al., 2008; Diesem, 1975; Prince, 1960; Stefánsson et al., 2005). Por ejemplo, el globo ocular porcino es ampliamente utilizado en la actualidad para el aprendizaje de técnicas de disección en medicina humana (Kivell et al., 2009). Asimismo, la retina del cerdo ha sido considerada de forma extensa en investigación de problemas en la

retina (Gekeler et al., 2007; Sachs et al., 2005) o en modelos de glaucoma crónico (Ruiz-Ederra et al., 2005).

El tamaño del ojo, el grosor de la esclera, la estructura del iris, o la consistencia del cuerpo vítreo del cerdo se pueden considerar comparables a los de la especie humana; más específicamente, el cristalino tiene un grosor y una curvatura posterior muy similares (Prince, 1960). Sin embargo, existen diferencias anatómicas importantes que deben ser tomadas en cuenta, como son la presencia de un músculo extraocular ausente en humanos (músculo retractor del globo ocular), la ausencia de una fovea centralis o diferencias vasculares en el nervio óptico (ausencia de una arteria retiniana central) (Bertschinger et al., 2008).

### **3.5.1. Patologías del cristalino descritas en cerdos *in vivo***

Actualmente existe un incremento de publicaciones sobre la anatomía del ojo porcino, probablemente debido a su utilización como modelo en investigación, como hemos subrayado anteriormente; sin embargo, existen muy pocas publicaciones referidas a la descripción de enfermedades oculares en el animal *in vivo*, debido a la condición de animal de renta: tienen una vida muy corta y no poseen atención individual (como es el caso de un animal de compañía) sino como colectivo (Middleton, 2010).

Aún así, algunos autores han descrito alteraciones del cristalino, como la presencia de opacidades congénitas en cerdos enanos entre 7-12 meses de edad (Saint-Macary and Berthoux, 1994) o de cataratas subcapsulares en animales adultos asociadas a la administración de higromicina B, un antibiótico aminoglucósido utilizado para el control de helmintos intestinales (Sanford et al., 1981), aunque existe controversia en dicha asociación fármaco con la producción de cataratas (Creighton et al., 1982). También se han observado opacidades ecuatoriales posteriores en lechones asociadas a deficiencias en niacina o riboflavina (Cargill et al., 1983).

### 3.6. REFERENCIAS DE LA INTRODUCCIÓN E INTRODUCCIÓN TEÓRICA

- Alcala, J., Katar, M., Rudner, G., Maisel, H., 1988. Human beta crystallins: regional and age related changes. *Curr Eye Res* 7, 353–359.
- Andley, U.P., Song, Z., Wawrousek, E.F., Fleming, T.P., Bassnett, S., 2000. Differential protective activity of alpha A- and alphaB-crystallin in lens epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 275, 36823–31.
- Artigas, J.M., Capilla, P., Felipe, A., Pujol, J., 1995. *Óptica fisiológica. Psicofísica de la Visión.*, First. ed. McGraw-Hill Interamericana, Madrid.
- Artigas, J.M., Felipe, A., Navea, A., Artigas, C., Menezo, J.L., 2012a. Ultraviolet radiation at Mediterranean latitudes and protection efficacy of intraocular lenses. *J Fr Ophtalmol* 36, 23–28.
- Artigas, J.M., Felipe, A., Navea, A., Fandino, A., Artigas, C., 2012b. Spectral transmission of the human crystalline lens in adult and elderly persons: color and total transmission of visible light. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 53, 4076–4084.
- Ayala, M., Strid, H., Jacobsson, U., Söderberg, P.G., 2007. p53 expression and apoptosis in the lens after ultraviolet radiation exposure. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 48, 4187–91.
- Ayala, M.N., Michael, R., Soderberg, P.G., 2000. Influence of exposure time for UV radiation-induced cataract. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41, 3539–3543.
- Bertschinger, D.R., Beknazar, E., Simonutti, M., Safran, A.B., Sahel, J.A., Rosolen, S.G., Picaud, S., Salzmann, J., 2008. A review of in vivo animal studies in retinal prosthesis research. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 246, 1505–17.
- Bochow, T.W., West, S.K., Azar, A., Munoz, B., Sommer, A., Taylor, H.R., 1989. Ultraviolet light exposure and risk of posterior subcapsular cataracts. *Arch Ophthalmol* 107, 369–372.
- Boettner, E.A., Wolter, J.R., 1962. Transmission of the Ocular Media. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1, 776–783.
- Bova, L.M., Sweeney, M.H., Jamie, J.F., Truscott, R.J., 2001. Major changes in human ocular UV protection with age. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42, 200–205.
- Brian, G., Taylor, H., 2001. Cataract blindness--challenges for the 21st century. *Bull World Heal. Organ* 79, 249–256.
- Candia, O.A., Mathias, R., Gerometta, R., 2012. Fluid circulation determined in the isolated bovine lens. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 53, 7087–96.
- Cargill, C.F., Giesecke, P.R., Heap, P.A., Whyte, P.B., 1983. Bilateral cortical cataracts in sows. *Aust. Vet. J.* 60, 312–3.
- Čejka, Č., Pláteník, J., Buchal, R., Guryca, V., Širc, J., Vejražka, M., Crkovská, J., Ardan, T., Michálek, J., Brůnová, B., Čejková, J., 2009. Effect of two different UVA doses on the rabbit cornea and lens. *Photochem. Photobiol.* 85, 794–800.

- Chiu, C.-J., Taylor, A., 2007. Nutritional antioxidants and age-related cataract and maculopathy. *Exp. Eye Res.* 84, 229–245.
- Chu, P.H.W., Chan, H.H.L., Ng, Y. fai, Brown, B., Siu, A.W., Beale, B.A., Gilger, B.C., Wong, F., 2008. Porcine global flash multifocal electroretinogram: Possible mechanisms for the glaucomatous changes in contrast response function. *Vision Res.* 48, 1726–1734.
- Creighton, M.O., Trevithick, J.R., Sanford, S.E., Dukes, T.W., 1982. Modelling cortical cataractogenesis. IV. Induction by hygromycin B in vivo (swine) and in vitro (rat lens). *Exp. Eye Res.* 34, 467–76.
- Cruickshanks, K.J., Klein, B.E., Klein, R., 1992. Ultraviolet light exposure and lens opacities: the Beaver Dam Eye Study. *Am J Public Heal.* 82, 1658–1662.
- Davidson, M., Nelms, S., 2007. Diseases of the canine lens and cataract formation En: Gelatt, KN. *Veterinary Ophthalmology.*, Fourth. ed. Blackbell Publishing.
- De Jong, W.W., Hendriks, W., 1986. The eye lens crystallins: Ambiguity as evolutionary strategy. *J. Mol. Evol.* 24, 121–129.
- Delaye, M., Tardieu, A., 1983. Short-range order of crystallin proteins accounts for eye lens transparency. *Nature* 302, 415–417.
- Derham, B.K., Harding, J.J., 1997. Effect of aging on the chaperone-like function of human alpha-crystallin assessed by three methods. *Biochem. J.* 328 ( Pt 3, 763–8.
- Diesem, C., 1975. Porcine sense organs and common integument. In: Getty R, editor. Sisson and Grossman's the anatomy of the domestic animals. Saunders, Philadelphia.
- Diffey, B.L., 1991. Solar ultraviolet radiation effects on biological systems. *Phys Med Biol* 36, 299–328.
- Dillon, J., Zheng, L., Merriam, J.C., Gaillard, E.R., 1999. The optical properties of the anterior segment of the eye: implications for cortical cataract. *Exp Eye Res* 68, 785–795.
- Dolin, P.J., 1994. Ultraviolet radiation and cataract: a review of the epidemiological evidence. *Br J Ophthalmol* 78, 478–482.
- Donaldson, P., Kistler, J., Mathias, R.T., 2001. Molecular Solutions to Mammalian Lens Transparency. *News Physiol Sci* 16, 118–123.
- Donaldson, P.J., Lim, J.C., 2008. "Membrane transporters: new roles in lens cataract," in *Ocular Transporters in Ophthalmic Diseases and Drug Delivery*. Humana Press, New Jersey, NJ, USA.
- Dong, X., Ayala, M., Lofgren, S., Soderberg, P.G., 2003. Ultraviolet radiation-induced cataract: age and maximum acceptable dose. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44, 1150–1154.
- Dong, X., Lofgren, S., Ayala, M., Soderberg, P.G., 2005. Maximum tolerable dose for avoidance of cataract induced by ultraviolet radiation-B for 18 to 60 week old rats. *Exp Eye Res* 80, 561–566.



- Douglas, R.H., Jeffery, G., 2014. The spectral transmission of ocular media suggests ultraviolet sensitivity is widespread among mammals. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 281.
- Evans, J.R., Fletcher, A.E., Wormald, R.P., Assessment, M.R.C.T. of, Management of Older People in the, C., 2004. Causes of visual impairment in people aged 75 years and older in Britain: an add-on study to the MRC Trial of Assessment and Management of Older People in the Community. *Br J Ophthalmol* 88, 365–370.
- Gaillard, E.R., Zheng, L., Merriam, J.C., Dillon, J., 2000. Age-related changes in the absorption characteristics of the primate lens. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41, 1454–1459.
- Gekeler, F., Szurman, P., Grisanti, S., Weiler, U., Claus, R., Greiner, T.-O., Völker, M., Kohler, K., Zrenner, E., Bartz-Schmidt, K.U., 2007. Compound subretinal prostheses with extra-ocular parts designed for human trials: successful long-term implantation in pigs. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 245, 230–41.
- Giblin, F.J., Leverenz, V.R., Padgaonkar, V.A., Unakar, N.J., Dang, L., Lin, L.R., Lou, M.F., Reddy, V.N., Borchman, D., Dillon, J.P., 2002. UVA light in vivo reaches the nucleus of the guinea pig lens and produces deleterious, oxidative effects. *Exp. Eye Res.* 75, 445–458.
- group, I. cataract study, 1991. Risk factors for age-related cortical, nuclear, and posterior subcapsular cataracts. The Italian-American Cataract Study Group. *Am J Epidemiol* 133, 541–553.
- Gum, G., Gelatt, K., Esson, D., 2007. Physiology of the eye. En: Gelatt, KN. *Veterinary Ophthalmology.*, Fourth. ed. Blackbell Publishing.
- Gwon, A., 2006. Lens regeneration in mammals: a review. *Surv. Ophthalmol.* 51, 51–62. d
- Gwon, A., Enomoto, H., Horowitz, J., Garner, M.H., 1989. Induction of de novo synthesis of crystalline lenses in aphakic rabbits. *Exp. Eye Res.* 49, 913–26.
- Gwon, A., Gruber, L.J., Mantras, C., 1993. Restoring lens capsule integrity enhances lens regeneration in New Zealand albino rabbits and cats. *J. Cataract Refract. Surg.* 19, 735–46.
- Hightower, K.R., Reddan, J.R., McCready, J.P., Dziedzic, D.C., 1994. Lens epithelium: a primary target of UVB irradiation. *Exp. Eye Res.* 59, 557–564.
- Hiller, R., Giacometti, L., Yuen, K., 1977. Sunlight and cataract: an epidemiologic investigation. *Am J Epidemiol* 105, 450–459.
- Kim, S.T., Koh, J.W., 2011. Mechanisms of apoptosis on human lens epithelium after ultraviolet light exposure. *Korean J Ophthalmol* 25, 196–201.
- Kivell, T.L., Doyle, S.K., Madden, R.H., Mitchell, T.L., Sims, E.L., 2009. An interactive method for teaching anatomy of the human eye for medical students in ophthalmology clinical rotations. *Anat Sci Educ* 2, 173–178.
- Kolozsvari, L., Nogradi, A., Hopp, B., Bor, Z., 2002. UV absorbance of the human cornea in the 240- to 400-nm range. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43, 2165–2168.
- Kyselova, Z., 2010. Mass spectrometry-based proteomics approaches applied in cataract research. *Mass Spectrom Rev* 30, 1173–1184.

- Lerman, S., Borkman, R., 1976. Spectroscopic evaluation and classification of the normal aging and cataractous lens. *Ophthalmol Res* 8, 335–353.
- Leske, M.C., Chylack Jr., L.T., Wu, S.Y., 1991. The Lens Opacities Case-Control Study. Risk factors for cataract. *Arch Ophthalmol* 109, 244–251.
- Li, W.C., Kuszak, J.R., Dunn, K., Wang, R.R., Ma, W., Wang, G.M., Spector, A., Leib, M., Cotliar, A.M., Weiss, M., et al., 1995. Lens epithelial cell apoptosis appears to be a common cellular basis for non-congenital cataract development in humans and animals. *J Cell Biol* 130, 169–181.
- Liang, J.N., Andley, U.P., Chylack Jr., L.T., 1985a. Spectroscopic studies on human lens crystallins. *Biochim Biophys Acta* 832, 197–203.
- Liang, J.N., Bose, S.K., Chakrabarti, B., 1985b. Age-related changes in protein conformation in bovine lens crystallins. *Exp Eye Res* 40, 461–469.
- Mao, Y.-W., Liu, J.-P., Xiang, H., Li, D.W.-C., 2004. Human alphaA- and alphaB-crystallins bind to Bax and Bcl-X(S) to sequester their translocation during staurosporine-induced apoptosis. *Cell Death Differ.* 11, 512–26.
- Marín, M.J., Sola, Y., Tena, F., Utrillas, M.P., Campmany, E., Cabo, X., Lorente, J., Martínez-Lozano, J.A., 2007. The UV Index on the Spanish Mediterranean Coast. *Photochem. Photobiol.* 81, 659–665.
- Martinez-Lozano, J.A., Utrillas, M.P., Gomez, V., 1994. Estimation of the diffuse solar irradiation from global solar irradiation. Daily and monthly average daily values. *Renew. Energy* 4, 95–100.
- Martínez-Lozano, J.A., Utrillas, M.P., Tena, F., Cachorro, V.E., 1998. The parameterization of the atmospheric aerosol optical depth using the Angstrom power law. *Sol. Energy* 63, 303–311.
- McCarty, C.A., Nanjan, M.B., Taylor, H.R., 2000. Attributable risk estimates for cataract to prioritize medical and public health action. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41, 3720–3725.
- Mehlen, P., Schulze-Osthoff, K., Arrigo, A., 1996. Small stress proteins as novel regulators of apoptosis. Heat shock protein 27 blocks Fas/APO-1- and staurosporine-induced cell death. *J Biol Chem* 271, 16510–16514.
- Michael, R., 2000. Development and repair of cataract induced by ultraviolet radiation. *Ophthalmic Res* 32 Suppl 1, ii–iii; 1–44.
- Michael, R., Vrensen, G.F., van Marle, J., Gan, L., Soderberg, P.G., 1998. Apoptosis in the rat lens after in vivo threshold dose ultraviolet irradiation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39, 2681–2687.
- Middleton, S., 2010. Porcine ophthalmology. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 26, 557–72.
- Mody Jr., V.C., Kakar, M., Elfving, A., Soderberg, P.G., Lofgren, S., 2006. Ultraviolet radiation-B-induced cataract in albino rats: maximum tolerable dose and ascorbate consumption. *Acta Ophthalmol Scand* 84, 390–395.

- Mody Jr., V.C., Kakar, M., Soderberg, P.G., Lofgren, S., 2012. High lenticular tolerance to ultraviolet radiation-B by pigmented guinea-pig; application of a safety limit strategy for UVR-induced cataract. *Acta Ophthalmol* 90, 226–230.
- Nahomi, R.B., Wang, B., Raghavan, C.T., Voss, O., Doseff, A.I., Santhoshkumar, P., Nagaraj, R.H., 2013. Chaperone peptides of  $\alpha$ -crystallin inhibit epithelial cell apoptosis, protein insolubilization, and opacification in experimental cataracts. *J. Biol. Chem.* 288, 13022–35.
- Nasa, 2011. Surface meteorology and Solar Energy. *Sol. Energy* 4–5.
- Okuda, J., Kawamura, M., Didelot, S., 1987. Anomeric preference in uptake of D-glucose and of D-galactose by rat lenses. *Curr Eye Res* 6, 1223–1226.
- Okuno, T., Ueda, T.N., Ueda, T., Yasuhara, H., Koide, R., 2012. Ultraviolet Action Spectrum for Cell Killing of Primary Porcine Lens Epithelial Cells. *J. Occup. Health* 54, 181–186.
- Oriowo, O.M., Cullen, A.P., Chou, B.R., Sivak, J.G., 2001. Action spectrum and recovery for in vitro UV-induced cataract using whole lenses. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42, 2596–2602.
- Oriowo, O.M., Cullen, A.P., Sivak, J.G., 2002. Impairment of eye lens cell physiology and optics by broadband ultraviolet A-ultraviolet B radiation. *Photochem. Photobiol.* 76, 361–367.
- Pasupuleti, N., Matsuyama, S., Voss, O., Doseff, A.I., Song, K., Danielpour, D., Nagaraj, R.H., 2010. The anti-apoptotic function of human  $\alpha$ A-crystallin is directly related to its chaperone activity. *Cell Death Dis.* 1, e31.
- Pedros, R., Utrillas, J.A., Martinez-Lozano, J.A., Tena, F., 1999. Values of broad band turbidity coefficients in a mediterranean coastal site. *Sol. Energy* 66, 11–20.
- Pirie, A., 1971. Formation of N'-Formylkynurenine in proteins from lens and other sources by exposure to sunlight. *Biochem J* 125, 203–208.
- Pitts, D.G., 1990. Sunlight as an ultraviolet source. *Optom Vis Sci* 67, 401–406.
- Pitts, D.G., Cullen, A.P., Hacker, P.D., 1977. Ocular effects of ultraviolet radiation from 295 to 365 nm. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 16, 932–939.
- Prince, J., 1960. The pig. In: *Anatomy and Histology of the Eye and Orbit in Domestic Animals*, First. ed. CC Thomas, Springfield, IL.
- Riley, M. V, Meyer, R.F., Yates, E.M., 1980. Glutathione in the aqueous humor of human and other species. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 19, 94–6.
- Ringvold, A., 1996. The significance of ascorbate in the aqueous humour protection against UV-A and UV-B. *Exp. Eye Res.* 62, 261–4.
- Ringvold, A., Anderssen, E., Kjønneksen, I., 2000. Distribution of ascorbate in the anterior bovine eye. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41, 20–23.
- Rosenthal, F.S., Bakalian, A.E., Taylor, H.R., 1986. The effect of prescription eyewear on ocular exposure to ultraviolet radiation. *Am J Public Heal.* 76, 1216–1220.

- Rosenthal, F.S., Phoon, C., Bakalian, A.E., Taylor, H.R., 1988. The ocular dose of ultraviolet radiation to outdoor workers. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 29, 649–656.
- Ruiz-Ederra, J., Garcia, M., Hernandez, M., Urcola, H., Hernandez-Barbachano, E., Araiz, J., Vecino, E., 2005. The pig eye as a novel model of glaucoma. *Exp Eye Res* 81, 561–569.
- Sachs, H.G., Schanze, T., Brunner, U., Sailer, H., Wiesenack, C., 2005. Transscleral implantation and neurophysiological testing of subretinal polyimide film electrodes in the domestic pig in visual prosthesis development. *J. Neural Eng.* 2, S57–64.
- Saint-Macary, G., Berthoux, C., 1994. Ophthalmic observations in the young Yucatan micropig. *Lab Anim Sci* 44, 334–7.
- Samuelson, D., 2007. Ophthalmic anatomy. En: Gelatt, KN. *Veterinary Ophthalmology*, Fourth. ed. Blackbell Publishing.
- Sanford, S.E., Dukes, T.W., Creighton, M.O., Trevithick, J.R., 1981. Cortical cataracts induced by hygromycin B in swine. *Am. J. Vet. Res.*
- Sasaki, H., Kawakami, Y., Ono, M., Jonasson, F., Shui, Y.B., Cheng, H.M., Robman, L., McCarty, C., Chew, S.J., Sasaki, K., 2003. Localization of cortical cataract in subjects of diverse races and latitude. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44, 4210–4214.
- Soderberg, P.G., 1988. Acute cataract in the rat after exposure to radiation in the 300 nm wavelength region. A study of the macro-, micro- and ultrastructure. *Acta Ophthalmol* 66, 141–152.
- Soderberg, P.G., 1990a. Experimental cataract induced by ultraviolet radiation. *Acta Ophthalmol Suppl* 1–75.
- Soderberg, P.G., 1990b. Development of light dissemination in the rat lens after in vivo exposure to radiation in the 300-nm wavelength region. *Ophthalmic Res* 22, 271–279.
- Sreekumar, P.G., Chothe, P., Sharma, K.K., Baid, R., Kompella, U., Spee, C., Kannan, N., Manh, C., Ryan, S.J., Ganapathy, V., Kannan, R., Hinton, D.R., 2013. Antiapoptotic properties of  $\alpha$ -crystallin-derived peptide chaperones and characterization of their uptake transporters in human RPE cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 54, 2787–98.
- Stark, W.S., Wagner, R.H., Gillespie, C.M., 1994. Ultraviolet sensitivity of three cone types in the aphakic observer determined by chromatic adaptation. *Vision Res.* 34, 1457–9.
- Stefánsson, E., Pedersen, D.B., Jensen, P.K., la Cour, M., Kiilgaard, J.F., Bang, K., Eysteinnsson, T., 2005. Optic nerve oxygenation. *Prog. Retin. Eye Res.* 24, 307–32.
- Taylor, H.R., West, S.K., Rosenthal, F.S., Munoz, B., Newland, H.S., Abbey, H., Emmett, E.A., 1988. Effect of ultraviolet radiation on cataract formation. *N Engl J Med* 319, 1429–1433.
- Tsukahara, N., Tani, Y., Kikuchi, H., Sugita, S., 2014. Light transmission of the ocular media in birds and mammals. *J. Vet. Med. Sci.* 76, 93–5.
- Umaphathy, A., Donaldson, P., Lim, J., 2013. Antioxidant delivery pathways in the anterior eye. *Biomed Res. Int.* 2013, 207250.

- Utrillas, M.P., Martínez-Lozano, J.A., Casanovas, A.J., 1991. Evaluation of models for estimating solar irradiation on vertical surfaces at Valencia, Spain. *Sol. Energy* 47, 223–229.
- Van Heyningen, R., 1959. Formation of Polyols by the Lens of the Rat with “Sugar” Cataract. *Nature* 184, 194–195.
- Varma, S.D., Kovtun, S., Hedge, K.R., 2011. Role of UV irradiation and oxidative stress in cataract formation. Medical prevention by nutritional antioxidants and metabolic agonists. *Eye Contact Lens* 37, 233–245.
- Vilupuru, A.S., Glasser, A., 2001. Optical and biometric relationships of the isolated pig crystalline lens. *Ophthalmic Physiol Opt* 21, 296–311.
- Vrensen, G.F.J.M., 1995. UV-B and early cortical and nuclear changes in the human lens. *Doc. Ophthalmol.* 88, 255–261.
- Wegener, A.R., 1995. In vivo studies on the effect of UV-radiation on the eye lens in animals. *Doc. Ophthalmol.* 88, 221–232.
- West, S., 1999. Ocular ultraviolet B exposure and lens opacities: a review. *J Epidemiol* 9, S97–101.
- West, S.K., 2000. Looking forward to 20/20: a focus on the epidemiology of eye diseases. *Epidemiol Rev* 22, 64–70.
- Wyszecki, G., Stiles, W.S., 2000. *Color Science – Concepts and Methods, Quantitative Data and Formulae*, Second. ed. John Wiley and Sons, New York.
- Yao, Z., Yu, H., Xuan, D., Sha, Q., Hu, J., Zhang, J., 2010. Analysis of protein-protein interactions and proteomic profiles of normal human lenses. *Curr Eye Res* 35, 605–619.
- Zhang, Z.-F., Zhang, J., Hui, Y.-N., Zheng, M.-H., Liu, X.-P., Kador, P.F., Wang, Y.-S., Yao, L.-B., Zhou, J., 2011. Up-regulation of NDRG2 in senescent lens epithelial cells contributes to age-related cataract in human. *PLoS One* 6.



## **MATERIALES Y MÉTODOS**





## **4.1. DISEÑO EXPERIMENTAL**

Nuestro estudio se realizó en las fases que detallamos a continuación.

1. Obtención y extracción de cristalinos de cerdo.
2. Estudio de distintos métodos de conservación de los cristalinos: en fresco, en formol, en suero salino fisiológico, en aceite de ricino y en criocongelación, para valorar las características de integridad y transmisión según los distintos medios.
3. Medición de la transmisión espectral de los cristalinos, y así establecer la curva estándar en la especie porcina; además, se determinó la transmisión espectral en diferentes tiempos, para comprobar posibles variaciones de la curva con respecto al tiempo.
4. Irradiación de cristalinos a diferentes intensidades y tiempos, para evaluar los efectos de las radiaciones UVA y UVB sobre la lente, a través de variaciones en la transmisión espectral.

## **4.2. OBTENCIÓN Y EXTRACCIÓN DE LOS CRISTALINOS DE CERDO**

### **4.2.1. Obtención de los ojos de cerdo**

Para los experimentos se utilizó un total de 75 cristalinos de cerdos recién sacrificados, obtenidos gracias a un convenio entre FISABIO Oftalmología Médica (FOM) y el matadero de Mercavalencia, que se comprometió a proporcionar ojos de cerdo semanalmente con fines de investigación y docencia.

Los cerdos eran sacrificados alrededor de los seis meses de vida. Tras la enucleación, que se realizaba inmediatamente después del sacrificio, los ojos eran almacenados en botes de plástico y enviados al laboratorio, donde se realizaba la extracción del cristalino.

Todos los procedimientos fueron llevados a cabo en las instalaciones de la FOM, que dispone de laboratorios así como de un quirófano experimental con material quirúrgico y microscopio binocular específico para la práctica y la manipulación de los cristalinos de cerdo; el instrumental disponible en dicho quirófano se empleó únicamente para el trabajo con ojos de cerdo, nunca en humanos.

#### **4.2.2. Extracción del cristalino**

Para la extracción del cristalino se realizó una incisión paralela al plano de la córnea, a 3 milímetros del limbo esclero corneal, utilizando un cuchillete de 15 grados (2.5 mm). A continuación se efectuó un corte de la esclera circular de 360° con tijeras Westcott conservando la distancia de 3 mm del limbo. Se retiró el rodete de córnea y esclera obtenido y se despegó el iris de su inserción. En este momento se realizaba una maniobra delicada para despegar el cristalino de la zónula, sin dañar la cápsula; era de utilidad cortar la zónula alrededor del cristalino antes de intentar levantar al mismo.

Una vez aislado el cristalino, se limpió con solución salina fisiológica al 0.9% (SSF), retirando los restos de vítreo y partes zonulares que pudieran permanecer unidos a él. Inmediatamente después se procedió a fotografiarlo y a conservarlo tal y como se explicará a continuación. Los botes se identificaron con un número según el orden cronológico de la extracción.

#### **4.2.3. Fotografía del cristalino**

En todos los casos se realizó una fotografía del cristalino, inmediatamente después de su extracción, para comprobar que la transparencia de la lente estaba intacta tras los procesos de obtención y conservación.

Las fotografías, de alta calidad, se obtuvieron con una cámara Nikon D7000. La distancia entre el objetivo y el cristalino fue siempre de 30 cm, al igual que el objetivo macro utilizado (Nikon AF-S Micronikkor 105 mm). Se utilizaron dos fuentes de luz blanca enfocadas hacia el cristalino y siempre a la misma posición (una a cada lado del objetivo de

la cámara). Se hizo una primera toma sobre papel de filtro blanco y una segunda fotografía sobre papel milimetrado.

### 4.3. CONSERVACIÓN DE LOS CRISTALINOS

La conservación de los cristalinos extraídos se planteó como primer objetivo en el estudio, dada la imposibilidad de realizar la totalidad de las medidas inmediatamente después de la extracción. Por ello, se realizaron experimentos previos para discernir, de entre las formas de conservación más comunes la más adecuada en nuestro caso.

#### *Cristalino recién extraído o “en fresco”*

Se midió la transmisión espectral en una muestra de cristalinos (n=6) recién extraídos y mantenidos durante un pequeño lapso de tiempo (dos horas) en SSF.

Con el objeto de analizar la dispersión de estas curvas, calculamos para 7 longitudes de onda representativas del espectro visible (400, 450, 500, 550, 600, 650 y 700 nm) el valor promedio y la desviación estándar (SD) de los valores correspondientes a las curvas de transmisión espectral de los seis cristalinos medidos.

#### *Conservación en suero salino fisiológico*

Se obtuvo la transmisión espectral en una muestra de 3 cristalinos en fresco y tras conservarlos en SSF durante 24 horas.

#### *Conservación en formol*

En este caso se introdujeron en formol 3 cristalinos durante 24 horas y se realizaron medidas de la transmisión espectral a las 24, 48, 72 y 96 horas. Asimismo, se sumergieron 4 cristalinos en formol durante 48h y posteriormente se midió la transmisión espectral, con el objeto de evaluar el amarilleamiento producido en el cristalino durante el primer experimento.

### *Conservación en aceite de ricino (Castor Oil)*

Se obtuvo la transmisión espectral en una muestra de cristalinos (n=3) tras sumergirlos en aceite de ricino en 4 tiempos: a las 24, 48, 72 y 96 horas. Seguidamente, como se tuvo dudas si la variación de transmisión podía ser por la película de aceite que queda adherida al cristalino, se realizó un segundo experimento midiendo la transmisión de una lámina de vidrio de 0,1 mm de espesor, antes y después de sumergirla en aceite de ricino.

### *Criocongelación*

El proceso de criocongelación se realizó en dos pasos, ya que la variación de temperatura excesivamente brusca en este proceso podría producir daños en los tejidos que conforman el cristalino. Así, una muestra de 3 cristalinos se congeló primero a  $-20^{\circ}\text{C}$ , y a continuación a  $-80^{\circ}\text{C}$ , temperatura a la cual se mantuvo durante 4 semanas. Posteriormente se midió la transmisión espectral después de un proceso de descongelación natural, es decir, a temperatura ambiente.

También se realizó la medición a diferentes tiempos : recién descongelado y luego a los 5, 10, 30 y 60 minutos después de la descongelación, con objeto de conocer si se producía alguna variación significativa durante el tiempo normal de manipulación en el laboratorio.

En conclusión y a la vista de los resultados que se expondrán ampliamente en el apartado de “Resultados y discusión”, optamos para nuestro estudio utilizar cristalinos recién extraídos y en los casos en los que el análisis debía realizarse posteriormente, se criocongelaron a  $-80^{\circ}$  y descongelaron a temperatura ambiente.

#### 4.4. MEDICIÓN DE LA TRANSMISIÓN ESPECTRAL DE LOS CRISTALINOS

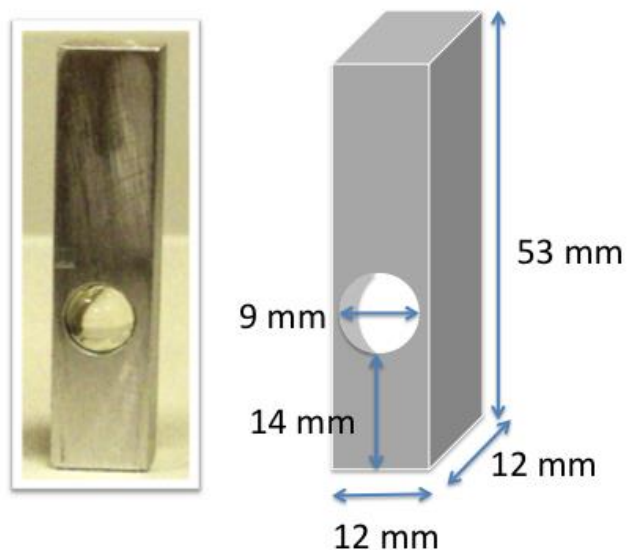
##### 4.4.1. Manipulación de los cristalinos

Con el fin de evitar daños en el cristalino debidos a la manipulación, se diseñó un soporte fabricado exclusivamente para los experimentos por nuestro equipo de investigación para realizar las diferentes medidas. En el portacristalinos, las lentes podían ser transportadas y manipuladas sin necesidad de tocarlas, asegurando así la transparencia y la conservación de sus propiedades ópticas iniciales (Figura 13).



**Figura 13.-** Portacristalinos utilizado en el estudio. Se observa cómo el cristalino de la izquierda ha sido irradiado con UV, mientras que el de la derecha permanece intacto.

Estos instrumentos se diseñaron y realizaron en el taller del Departamento de Óptica de la Universidad de Valencia. Están hechos de aluminio y se modelaron para encajar exactamente en el portamuestras del espectrofotómetro. Las dimensiones del portacristalinos pueden verse en la figura 14.



**Figura 14.** Dimensiones de los portacristalinos diseñados para los experimentos.

Los portacristalinos permitían realizar medidas tanto en seco como en húmedo (Figura 15), aunque en nuestro estudio sólo se utilizaron en seco. A la derecha de dicha figura puede verse el estuche con la cubeta original del aparato que es completamente transparente para el intervalo de espectro utilizado lo que implica que sea de cuarzo para que deje pasar la radiación UV, y está formada por láminas planoparalelas. Esta cubeta encaja perfectamente en el habitáculo del espectrofotómetro.



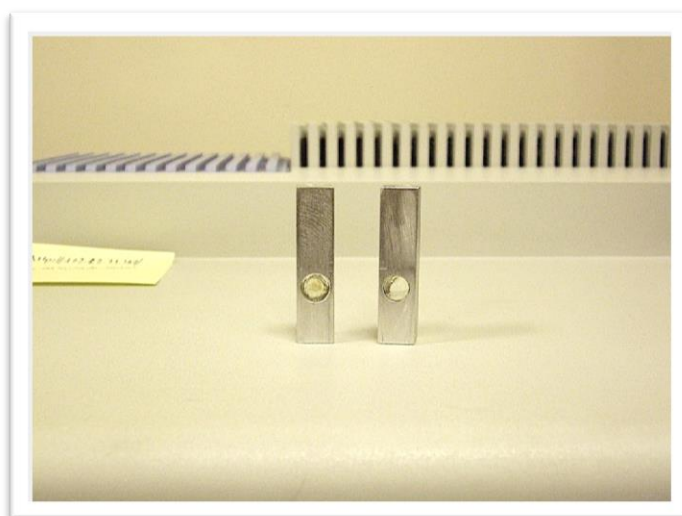
**Figura 15.-** Portacristalinos para la medida de la transmisión espectral.

La siguiente figura (Figura 16) muestra los portacristalinos para medidas en húmedo, con el tamaño exacto para que encajaran en las cubetas portamuestra del espectrofotómetro. Esta cubeta a su vez se introducía en el habitáculo situado a la entrada de la esfera integradora.



**Figura 16.-** Portacristalinos para la medida en húmedo con la cubeta transparente correspondiente.

En la próxima figura (Figura 17) se muestran los portacristalinos para las medidas en seco. En este caso el mismo portacristalinos encajaba perfectamente en el habitáculo antes citado, de forma que el cristalino quedaba situado a la entrada de la esfera integradora.

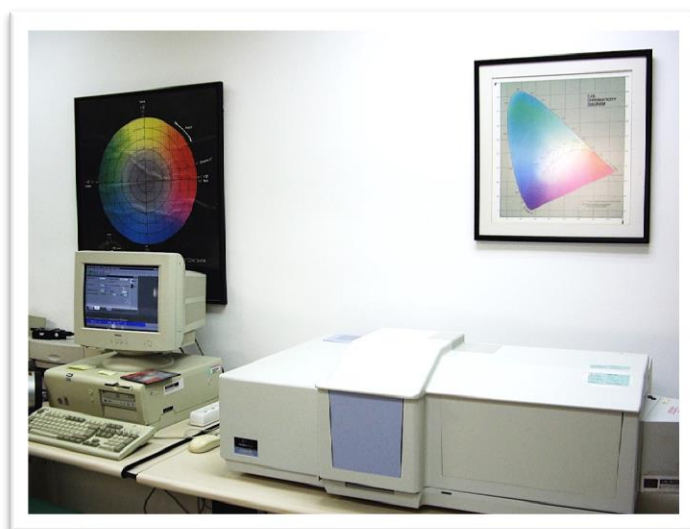


**Figura 17.-** Portacristalinos para la medida en seco de la transmisión espectral. Se aprecia que el cristalino de la izquierda ha sido irradiado con UV y presenta opacidad.

#### 4.4.2. Descripción de los aparatos de medida

Se utilizaron dos espectrofotómetros Perkin- Elmer, modelos Lambda 800 (UV/VIS) y Lambda 35 (UV/VIS) (Perkin-Elmer Inc., Massachusetts, USA).

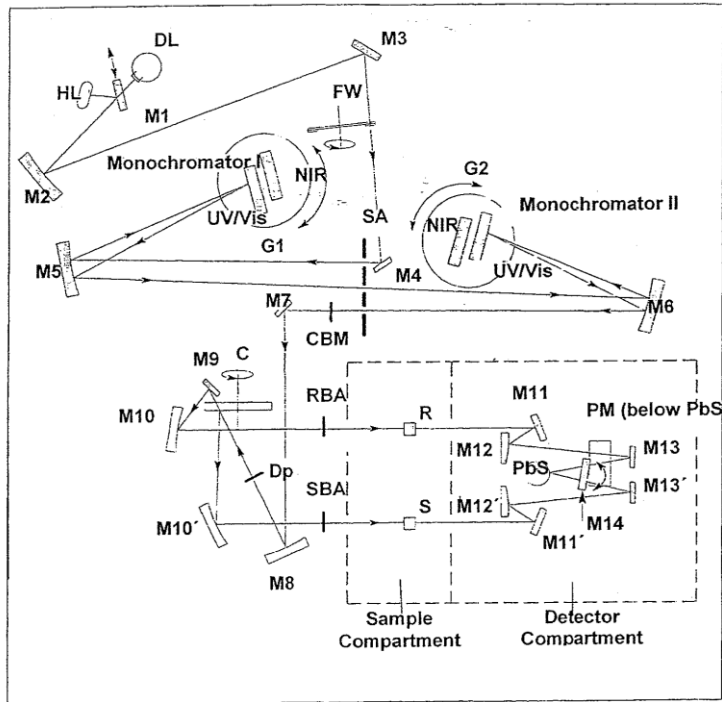
El modelo Lambda 800 opera en el rango del visible, el UV y el infrarrojo cercano (NIR), siendo además de doble haz y doble monocromador, cuya comparación la registra el sistema óptico del dispositivo ( Figura 18).



**Figura 18.-** Espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 800 (UV/VIS).

Los componentes ópticos están revestidos de sílice lo que les confiere una gran durabilidad. Los monocromadores seleccionan las diferentes longitudes de onda mediante redes holográficas tanto en el rango visible, en el ultravioleta o infrarrojo. El sistema óptico del aparato se muestra esquemáticamente en la Figura 19.





**Figura 19.-** Esquema del sistema óptico de los espectrofotómetros utilizados en el estudio.

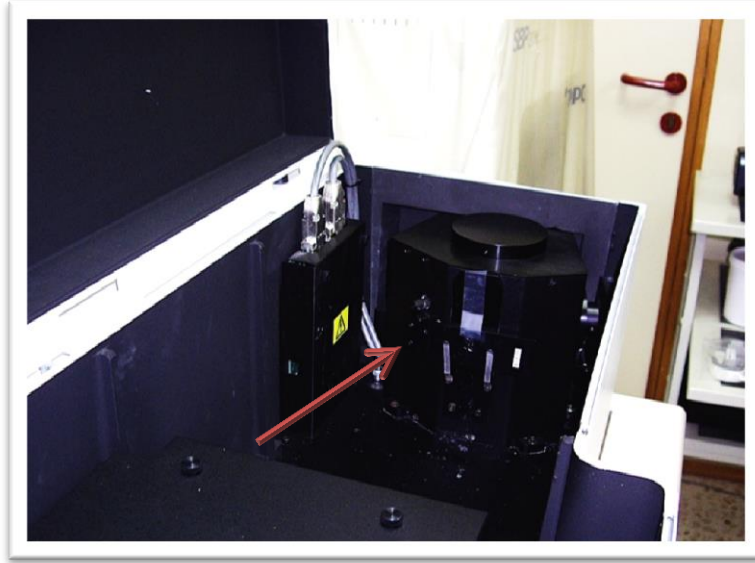
El espectrofotómetro utiliza dos fuentes de radiación: una lámpara halógena (HL) para el visible y el infrarrojo y una lámpara de deuterio (DL) para el UV. El cambio de fuente es automático durante el barrido que el monocromador hace del espectro.

Según se observa en la Figura 8, la luz de la fuente pasa a través de diferentes filtros ópticos colocados sobre un disco giratorio (FW) que lo controla un motor paso a paso y que está sincronizado con el monocromador. Dependiendo de la longitud de onda seleccionada, se coloca el apropiado filtro óptico en el camino del haz de luz, como un prefiltro antes de entrar, a través de una rendija (SA), en el Monocromador I. La radiación es colimada por el espejo M5 y reflejada sobre la red G1. Según el intervalo de longitudes de onda que se necesite el haz colimado se dirigirá a una red holográfica o a otra. La radiación es entonces dispersada produciéndose el espectro y según la rotación de la red se selecciona una zona del espectro que es dirigida a la rendija de salida. Esta rendija de salida sirve de entrada al Monocromador II. La radiación reflejada por el espejo M6 entra en la red rotatoria G2 (sincronizada con la G1) para salir otra vez a través del espejo M6 y después de atravesar la rendija de salida incidir en el espejo M7. La radiación que emerge de esta rendija de salida es extremadamente monocromática, es decir espectralmente muy pura. En el intervalo que comprende el espectro visible y el infrarrojo, es posible además seleccionar la anchura de la rendija.

A partir del espejo M7 el rayo de luz es reflejado vía el espejo toroidal M8 hacia un disco dentado rotatorio que incorpora un segmento de espejo, un segmento abierto y dos segmentos opacos, de forma que el rayo de luz alternativamente se refleja en el espejo, pasa a través del segmento abierto y es bloqueado por los segmentos opacos. Cuando pasa por el segmento abierto, el rayo alcanza el espejo M9 y reflejado también por el M10 crea el rayo de referencia (R). Cuando se refleja en el segmento de espejo, el rayo es reflejado por el espejo M10 hacia la muestra S. Cuando los segmentos opacos se interponen en el camino del rayo ninguna radiación llega al detector, permitiendo entonces al detector crear la señal cero.

La radiación pasa alternativamente a través de la muestra y la referencia alcanzando en cada caso el detector apropiado. Un fotomultiplicador amplifica las señales de los detectores, permitiendo registrarlas y almacenarlas en el procesador que posteriormente las muestra como tabla de resultados y gráficas.

Las medidas se realizaron, como es lógico, por transmisión tomando como referencia el aire (al que se le asignó una transmisión del 100%). Asimismo se calculó la transmisión total, es decir, no sólo se tenía en cuenta la radiación que después de atravesar la muestra incidía directamente sobre el detector, sino que se sumaba también la de la luz esparcida (scattering). Para ello, el aparato contaba con una esfera integradora que recogía por reflexión toda la luz que atravesaba la muestra (Figura 20 y 21). Los cristalinos fueron colocados directamente en el orificio de entrada del espectrofotómetro, introducidos en los portacristalinos diseñados expresamente para estas medidas, los cuales se colocaban a la entrada de la esfera integradora.



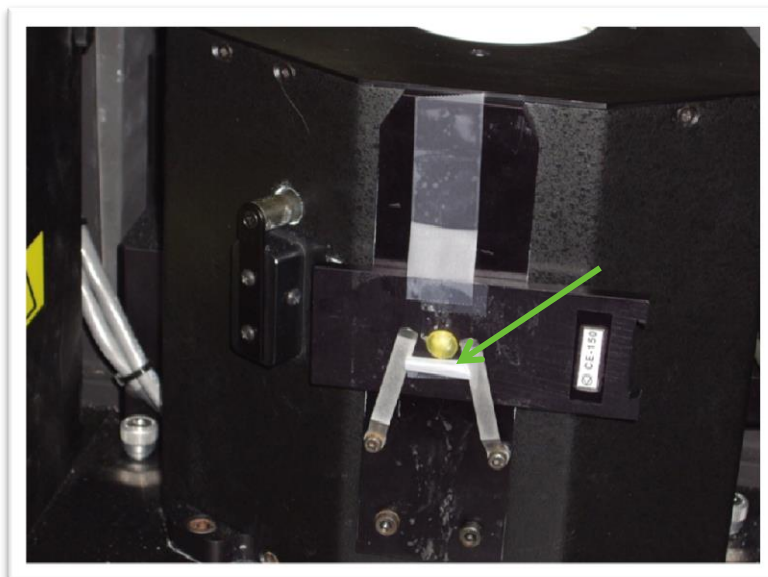
**Figura 20.-** Esfera integradora del espectrofotómetro P-E Lambda 800. Se corresponde con la caja negra que se observa señalada por la flecha y que por el interior está revestida interiormente de un blanco perfecto.

La figura 21 se muestra en detalle la esfera integradora, donde puede verse el pequeño orificio de entrada donde se colocaba la muestra para ser irradiada por las diferentes longitudes de onda, que después de ser transmitida por la muestra, penetraba en la esfera integradora donde su intensidad total era evaluada por el detector correspondiente.



**Figura 21.-** Orificio de entrada de la esfera integradora del espectrofotómetro P-E Lambda 800.

La Figura 22 muestra también la esfera integradora, pero donde ya se ha colocado en el orificio de entrada una lente intraocular con filtro amarillo. Puede observarse además en la parte superior de la figura el interior de la esfera integradora, ya que se ha abierto la tapa superior que en la Figura 18 permanecía cerrada.



**Figura 22.-** Orificio de entrada de la esfera integradora del espectrofotómetro P-E Lambda 800, con una lente intraocular colocada en dicho orificio.

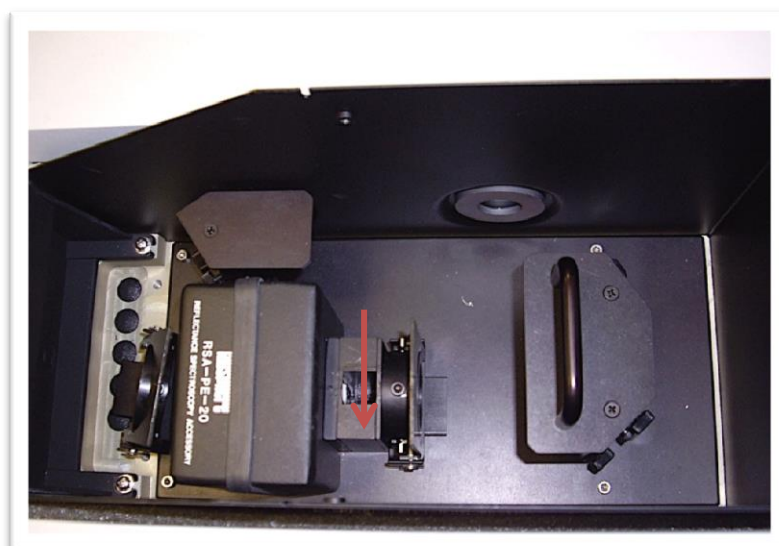
El segundo modelo de espectrofotómetro utilizado en este estudio fue el Perkin-Elmer Lambda 35 (UV/VIS) que puede verse en la figura 23. Este aparato es básicamente similar al anterior, pues registra la transmisión espectral desde los 200 nm hasta los 800 nm, es decir abarca parte del ultravioleta C y todo el UVB y UVA además del espectro visible. Es también, como el modelo anterior, de doble monocromador, por lo que su sistema óptico es similar al mostrado en la figura 19, y su diferencia fundamental viene dada por su menor precisión y rapidez en la medida. En un principio se utilizó el primero para el primer experimento sobre la conservación de los cristalinos, pero dado que dicho aparato se encontraba en el Instituto Tecnológico de Óptica, Color e Imagen (AIDO) y el resto de nuestros experimentos se iban a realizar en la FOM donde se encontraba el Perkin-Elmer Lambda 35, optamos por cambiar de aparato puesto que la diferencia de precisión no variaba nuestros resultados. Además, el segundo presentaba la ventaja de poder utilizar el mismo portacristalino tanto para ser irradiado con luz UV como para efectuar la medida de la transmisión espectral, con lo que la manipulación de la lente era menor. Por otro lado,

también presentaba la ventaja de poder sustituir fácilmente la esfera integradora por un sistema de doble haz, lo que es muy práctico cuando por ejemplo se quiera determinar el “scattering” producido por un cristalino.



**Figura 23.-** Espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 35 (UV/VIS).

La figura 24 muestra el compartimento del espectrofotómetro donde se colocan las muestras.



**Figura 24.-** Compartimento del espectrofotómetro P-E Lambda 35 donde se ve la esfera integradora (marcada con letras) y el habitáculo cuadrado (a la derecha de la esfera, marcado con una flecha) donde se colocaban las lentes dentro del portacristalinos.

#### 4.4.3. Medidas

La transparencia se estudió determinando la transmisión espectral de 12 cristalinos de cerdo inmediatamente tras su extracción o descongelados, con longitudes de onda entre 200 y 800 nm. De esta forma abarcamos el espectro visible, algo de infrarrojo cercano y el UV; en este último caso se tuvo en cuenta todo el UVA (desde 315 nm hasta 380 nm) y el UVB (290-315 nm).

Además, en 3 cristalinos se estableció la transmisión espectral a 10, 20, 30, 40 y 60 minutos, para comprobar posibles variaciones de la curva con respecto al tiempo.

#### 4.5. IRRADIACIÓN DE LOS CRISTALINOS

##### 4.5.1. Fuente de radiación ultravioleta

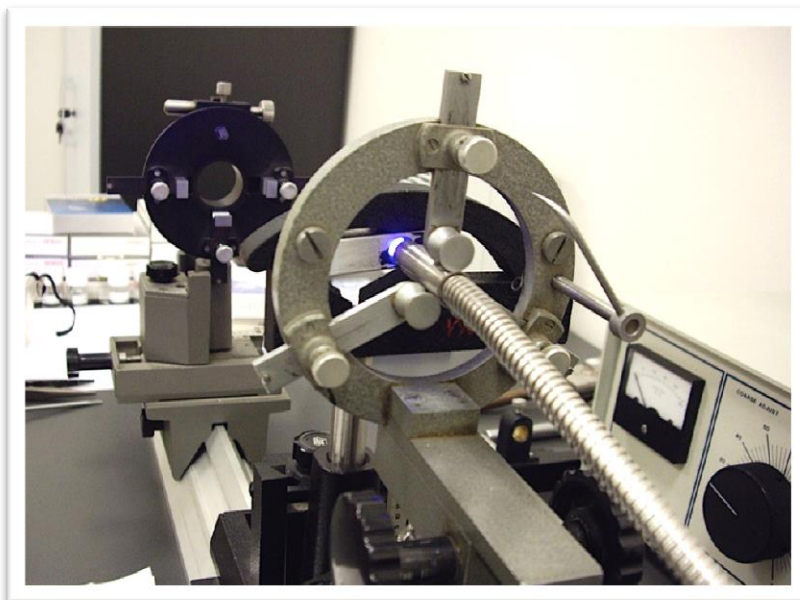
En este estudio contamos con una fuente en la que era posible controlar con precisión la intensidad radiada y el tiempo de exposición, así como dirigir con facilidad y exactitud el haz de radiación sobre la muestra. Para ello utilizamos una fuente de luz *Asahi-Spectra Xe Light Source Lax-C100* (Asahi Spectra USA Inc., California, USA)(Figura 25).



**Figura 25.-** Fuente de luz ultravioleta Asahi-Spectra Lax-C100.

Esta fuente de luz es básicamente una lámpara de Xe de 100 W que incorpora unos módulos de espejos de alta transmitancia, lo que permite seleccionar bandas de longitudes de onda principalmente dentro del espectro visible y UV, más concretamente 4 tipos: UVB, UVA, VIS e IR. El módulo de espejos utilizado en este estudio, nos permitió seleccionar una banda de longitudes de onda desde 300 nm a 400 nm, es decir, cubriendo el UVA y parte del UVB. Para irradiar solamente con el UVA, se incorporó un filtro que no dejaba pasar precisamente ese rango (300-315), de forma que la banda utilizada era en ese caso de 315-400 nm, es decir el UVA. Además de estos filtros pasa-banda, se contó con filtros que interponiéndolos en el camino del haz de luz permitía seleccionar una longitud de onda específica. La intensidad de la radiación emitida se controló mediante un filtro gris continuo que permitía variar la intensidad de la luz emitida desde el 100% hasta el 5%.

La radiación emergente era dirigida mediante una fibra óptica (ver en la Figura 26 el cable que sale del aparato) hacia la posición más adecuada para irradiar las lentes colocadas dentro del portacrystalinos, tal y como se muestra en la Figura 25. La flexibilidad de la fibra óptica permitía posicionar el haz emergente con facilidad sobre la muestra.



**Figura 26.-** Fibra óptica flexible para irradiar directamente el cristalino colocado en el porta.

#### 4.5.2. Protocolo de medición

Una vez colocada la lente dentro del portacristalinos (Figura 27), éste era colocado en el habitáculo correspondiente del espectrofotómetro, tal y como se muestra en la Figura 28.



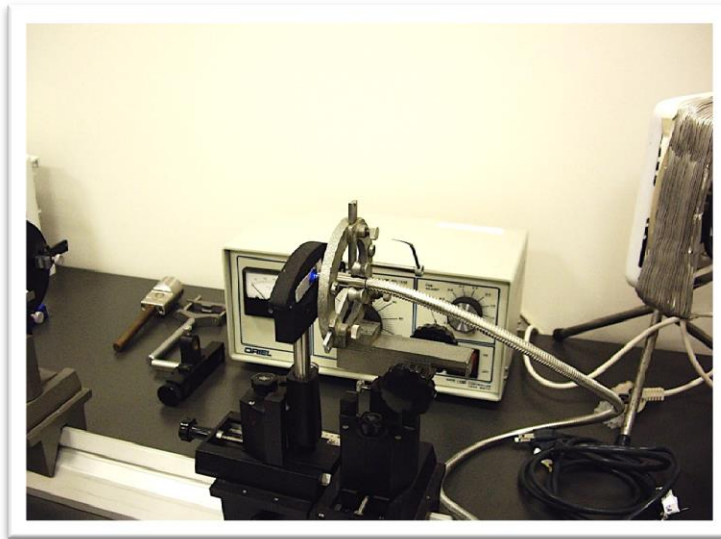
**Figura 27.-** *Cristalino de cerdo colocado en el portacristalinos.*



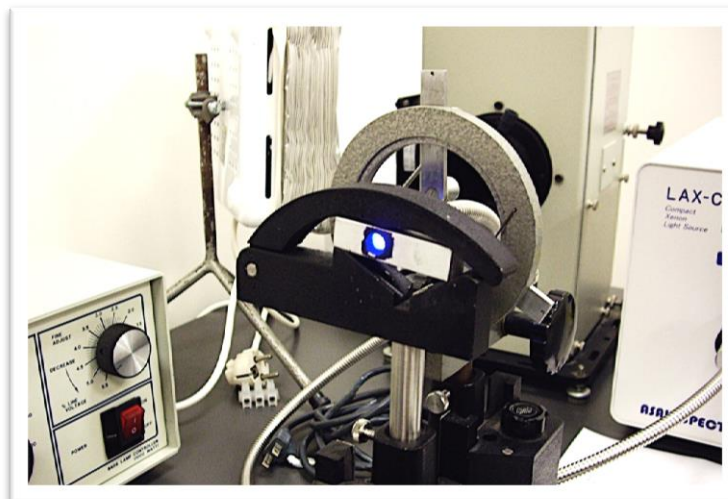
**Figura 28.-** *Colocación de la lente dentro del portacristalinos en el espectrofotómetro para la medida de la transmisión espectral.*



En primer lugar se medía la transmisión espectral del cristalino a tiempo cero ( $T_0$ ). A continuación, se sacaba el porta del espectrofotómetro y sin tocar el cristalino se colocaba en la pinza que permitía que el cristalino quedara situado justo delante de la fibra óptica que emitía la radiación elegida (Figuras 29 y 30).



**Figura 29.-** El portacristalinos colocado en posición horizontal y delante de la fibra óptica que emitía la radiación ultravioleta para su irradiación.

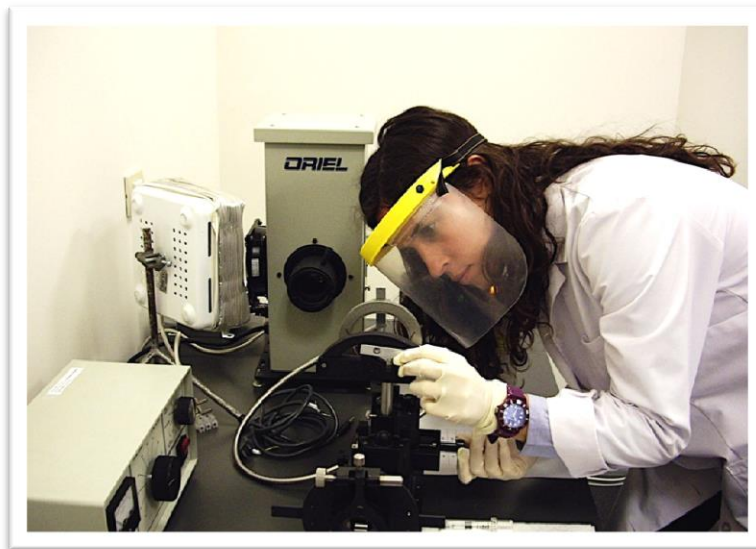


**Figura 30.-** Irradiación del cristalino colocado en posición horizontal en la pinza. Como las bandas de radiación utilizadas llegaban hasta 400 nm y el espectro visible se extiende más o menos desde el 380 nm, se puede observar algo de luz azul.

### 4.5.3. Medidas de protección

El hecho de utilizar radiación UV implica peligro para la persona que realiza los experimentos. Está bien documentado que tiene influencia clara en el desarrollo de cáncer de piel y existen indicios, a partir de estudios epidemiológicos como hemos explicado en el apartado de Introducción teórica, que influye en la formación de cataratas. Este efecto dañino es grave en el caso de la radiación UVB debido a lo energética que es, y depende no sólo de la intensidad de la radiación sino también del tiempo de exposición, siendo además sus efectos acumulativos. (Ayala et al., 2000; Dong et al., 2005; Galichanin et al., 2010; Sasaki et al., 2003) Debido al gran número de medidas realizadas en el laboratorio, fue necesario tomar las precauciones oportunas.

Por ello, se utilizaron gafas o protectores totales de la cara homologados como filtros de la radiación ultravioleta, así como guantes para exponer la menor superficie de piel posible (Figura 31). Una vez colocada la muestra y encendida la fuente de radiación, se procuraba alejar a todo personal de ella y si era posible, salir del laboratorio mientras duraba la exposición.



**Figura 31.-** Medidas de protección frente a la radiación ultravioleta.

#### 4.5.4. Medidas

En nuestro estudio hemos utilizado diferentes variables que conciernen al tipo de radiación, a su intensidad y al tiempo de exposición, para así poder analizar algunos valores de los principales factores que influyen en la acción de la radiación UV en los seres vivos.

##### *Tipo de radiación*

Hemos utilizado dos bandas de la zona del UV que se corresponden con la radiación que llega a la superficie de la tierra.

- **UVA (315-400 nm):** Esta banda comprende la radiación UVA con algo de radiación visible. Teniendo en cuenta que por convenio se considera el UVA el rango comprendido entre 315 y 380 nm, la banda utilizada en nuestro estudio incluye también el extremo azul del espectro visible (380-400 nm). En cualquier caso, a este tipo de radiación la llamaremos en adelante radiación UVA, pues es la que se corresponde, en mayor o menor grado, con la radiación UVA presente en la radiación solar.
- **UVB (300-400 nm):** El otro tipo de radiación usada en este estudio es la banda comprendida entre 300 nm y 400 nm. Como se puede observar, se corresponde con el rango anterior, pero se añade el intervalo comprendido entre 300 y 315 nm. Este segundo tipo de radiación se denominará en adelante simplemente UVB.

##### *Intensidad de la radiación*

Hemos escogido dos valores relativamente altos con objeto de que los posibles efectos que pudieran provocar en el cristalino, lo hicieran en un tiempo no excesivamente largo. En caso contrario podría incidir en nuestro estudio el tiempo transcurrido desde la

extracción del cristalino. Los valores que mejor se ajustan a estas condiciones son los de 20 J/cm<sup>2</sup> y 10 J/cm<sup>2</sup>, ya que provocan efectos apreciables (sea con UVA o UVB) en la transmisión espectral en tiempos aceptables para un experimento de laboratorio.

### *Tiempo de exposición*

El tiempo de exposición se determinó entre 5 y 30 minutos dependiendo del tipo de radiación, de manera que a mayor intensidad, se aplicaba un menor tiempo de exposición. Esto se debe a que cuanto más energética es la radiación, menos tiempo requiere para producir alteraciones en el elemento en el que incide.

Nuestro protocolo de medición fue, por todo lo expuesto anteriormente, el siguiente:

#### -Radiación UVA

- A 10 J/cm<sup>2</sup>, con un tiempo de irradiación de 5, 20 y 30 minutos.
- A 20 J/cm<sup>2</sup>, con un tiempo de irradiación de 5, 20 y 30 minutos.

#### -Radiación UVB

- A 10 J/cm<sup>2</sup>, con un tiempo de irradiación de 5, 10 y 20 minutos.
- A 20 J/cm<sup>2</sup>, con un tiempo de irradiación de 5, 10 y 20 minutos.

Todas las medidas se repitieron en 3 cristalinos diferentes para cada uno de los tiempos de irradiación.

Por otro lado, y con el objeto de estudiar la posible regeneración del epitelio del cristalino, a pesar de estar enucleado, se utilizaron cristalinos ya irradiados con la radiación UVA (315-400nm) y se realizaron las medidas de la transmisividad inmediatamente después y a los, 5, 10, 20, 65 y 110 minutos de la exposición. Asimismo, tras la irradiación

con UVB se realizaron medidas en T0, T5, T10, T15 y T20, para posteriormente medir a los 30 minutos de T20 (T50) y a la hora y media (T110).

#### 4.6. CÁLCULOS ESTADÍSTICOS

En este estudio se realizaban varias mediciones sobre un mismo cristalino, y cuando esto ocurre no estamos tratando con una variable estadística, por tanto se procede como es habitual en el tratamiento de datos no aleatorios: valorando el número de medidas necesarias para tener un error de dispersión aceptable (menor del 5%) y tomando el valor medio de dichas medidas.

Sin embargo, cuando se trata de caracterizar el cristalino de cerdo a partir de las medidas de una muestra de cristalinios diferentes sí necesitamos utilizar la inferencia estadística.

Para los cálculos estadísticos utilizamos el programa IBM SPSS 19 (IBM Corporation, Armonk, NY; USA). De todas las medidas de los cristalinios para cada exposición y tiempo se hicieron medias y desviaciones estándar (SD).

Se comprobó en el experimento que estudia la curva de transmisión del cristalino de cerdo, que estadísticamente no hay diferencia entre la media de 12 cristalinios y la media de tres (esta conclusión se desarrolla en el apartado de resultados), por lo que se decidió realizar 3 mediciones para cada exposición y tiempo. El grado de significación se estableció considerando que se asume un error máximo del 10% ( $p < 0.1$ ).

El test Kolmogorov-Smirnov fue el elegido para comprobar que las curvas de la transmisión del cristalino del cerdo común siguen una distribución Normal (o Gaussiana) de probabilidad. El test de Student se utilizó para valorar el grado de significación de las diferencias obtenidas entre dos conjuntos de curvas.

#### 4.7. REFERENCIAS DE MATERIALES Y MÉTODOS

Ayala, M.N., Michael, R., Soderberg, P.G., 2000. Influence of exposure time for UV radiation-induced cataract. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41, 3539–3543.

Dong, X., Lofgren, S., Ayala, M., Soderberg, P.G., 2005. Maximum tolerable dose for avoidance of cataract induced by ultraviolet radiation-B for 18 to 60 week old rats. *Exp Eye Res* 80, 561–566.

Galichanin, K., Lofgren, S., Bergmanson, J., Soderberg, P., 2010. Evolution of damage in the lens after in vivo close to threshold exposure to UV-B radiation: cytomorphological study of apoptosis. *Exp Eye Res* 91, 369–377.

Sasaki, H., Kawakami, Y., Ono, M., Jonasson, F., Shui, Y.B., Cheng, H.M., Robman, L., McCarty, C., Chew, S.J., Sasaki, K., 2003. Localization of cortical cataract in subjects of diverse races and latitude. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44, 4210–4214.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**





## 5.1. MANIPULACIÓN DE LOS CRISTALINOS DE CERDO

La utilización de cristalinos de cerdo intactos y frescos para un estudio *in vitro* del efecto de la radiación UV es novedosa. Como se explica en la introducción, el cerdo es un buen modelo a la hora de extrapolar resultados en humanos, debido a sus semejanzas filogenéticas. (Kivell et al., 2009; Middleton, 2010) Sin embargo, los pocos estudios en este tema realizados en ojos de cerdo utilizan sólo las células del epitelio (diseccionando el cristalino) o los cristalinos enteros cultivados durante una semana en un medio preparado (Okuno et al., 2012; Oriowo et al., 2002, 2001).

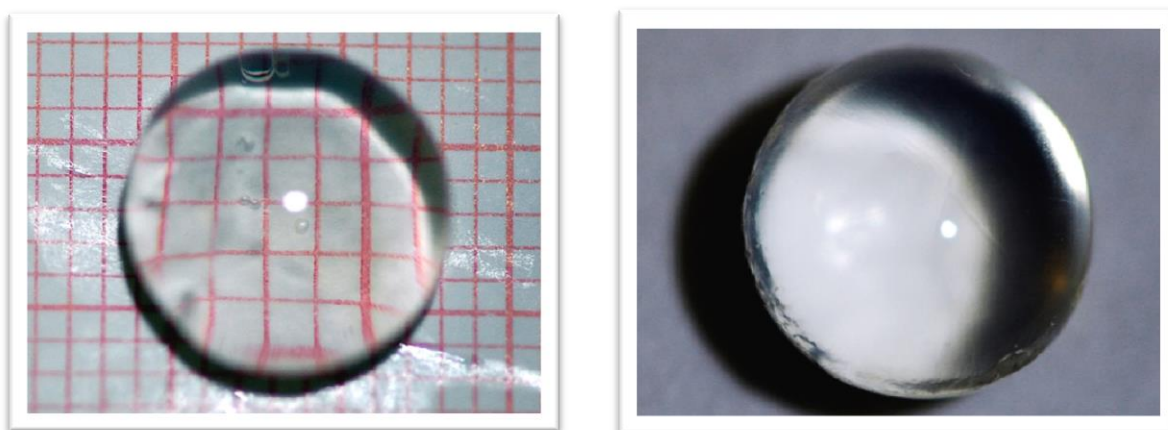
El hecho de realizar un estudio *in vitro*, permitió realizar una manipulación muy precisa de los cristalinos, sin los inconvenientes y limitaciones de trabajar con un biomodelo como el cerdo, sobre todo en lo que respecta a su manejo y tamaño. Por otra parte, somos conscientes de que existen diferencias con respecto a realizar las medidas *in vivo*, como es la absorción de la radiación UV por el resto de los medios oculares, que consiguen que a la retina sólo alcance el 1% de la radiación UV que llega al ojo (Youn et al., 2011).

De los filtros UV oculares, se considera al cristalino como el más eficaz, habiéndose descrito un incremento en la radiación que llega a la retina en personas a las que se les extrae el cristalino mediante cirugía (Youn et al., 2011). Como ya vimos en la introducción teórica, la córnea absorbe esencialmente toda la radiación de longitud de onda inferior a 290 nm, transmite el resto de UV y toda la radiación visible y es un filtro importante de IR. El humor acuoso absorbe sólo un 20% del UV, una parte despreciable de la luz visible y una absorción significativa de IR por encima del 50%. El humor vítreo es transparente a toda la radiación y presenta únicamente una pequeña barrera de absorción en el IR. Sin embargo, el cristalino absorbe entre 300 y 400 nm de la radiación UV, y es el filtro que evita que el UVA llegue a la retina (Ambach et al., 1994; Artigas et al., 1995). Dado que a la superficie terrestre no llega radiación por debajo de los 300 nm, ya que la atmósfera y el ozono filtran dichas longitudes de onda, se puede concluir que la mayor protección frente a los rayos UV recae sobre el cristalino (Ayala et al., 2000).

La homogeneidad de la muestra en nuestro estudio es un punto clave para la fiabilidad de los resultados. La posibilidad de obtener ojos de cerdos recién sacrificados de la misma edad y alimentados y tratados de igual forma, garantiza la uniformidad de las medidas.

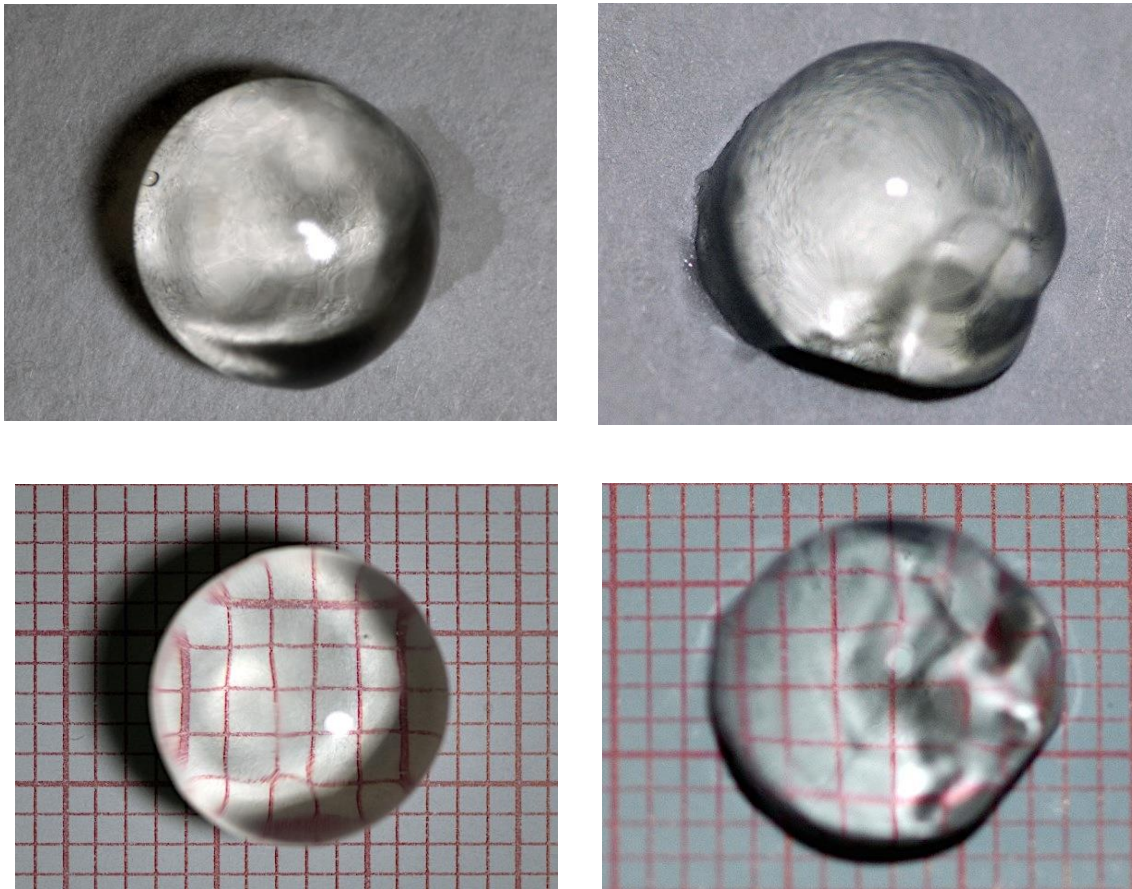
El cristalino es esencialmente una lente, es decir, un instrumento óptico cuyo objetivo es el de formar una imagen del mundo exterior sobre la retina que el cerebro se encargará de procesar e interpretar. Por otra parte, la mayor o menor similitud de la transmisividad con el cristalino humano nos dirá hasta qué punto son extrapolables los resultados.

La transparencia del cristalino depende del orden y homogeneidad de sus células y proteínas. Cualquier alteración en dicho orden, debido por ejemplo a agregación de proteínas o degeneración de la membrana celular, resultan en cambios a nivel local en el índice de refracción (Michael and Brismar, 2001). Esta transparencia ha sido determinada en nuestro trabajo mediante la medida de la curva de transmisión espectral, con un espectrofotómetro que abarca tanto el espectro visible como el UV. Para obtener resultados fiables se hacía indispensable que las propiedades de los cristalinos no fueran alteradas en los procesos de extracción y conservación. Aunque la extracción se realizaba con sumo cuidado, la transparencia de las lentes era comprobada realizando una fotografía (Figuras 32 y 33).



**Figuras 32 y 33.** *Cristalinos de cerdo recién extraídos con fondo de papel de filtro blanco y milimetrado.*

Sin embargo, en ocasiones la manipulación o la posterior conservación de los cristalinos originaba el deterioro del aspecto, forma o transparencia, como puede apreciarse en la Figura 34. En estos casos fueron descartados del estudio.

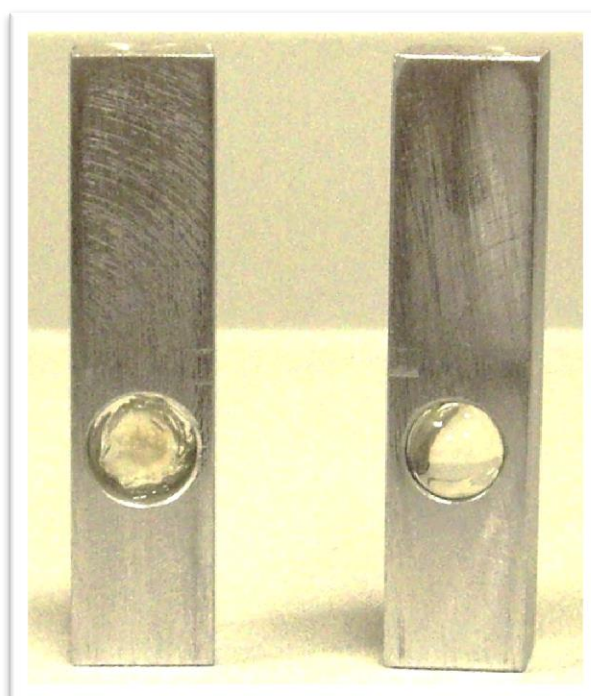


**Figura 34.-** Deterioro del cristalino recién extraído por manipulación.

Para evitar daños en la lente por la manipulación, dada su fragilidad y el número de medidas realizadas, se decidió diseñar un soporte en el que, una vez colocado el cristalino, era transportado sin necesidad de tocarlo (Figura 35), al mismo tiempo que nos permitía realizar medidas así como irradiar el cristalino directamente, puesto que sólo hay aire entre la fuente de UV o el espectrofotómetro y el cristalino.

El diseño del portacristalinos es novedoso, en nuestro conocimiento no ha sido utilizado en estudios previos y ha sido fundamental para garantizar la integridad de las lentes, y por ello, la fiabilidad de las medidas. En un estudio en lentes humanas explantadas, en las que la cápsula había sido eliminada, se colocaban en un soporte de cuarzo para ser irradiadas (Kessel et al., 2011); posteriormente, tuvieron que utilizar una fórmula para medir la transmisión teniendo en cuenta el espectro de la cubeta de cuarzo. Oriowo y sus colaboradores (Oriowo et al., 2001) colocan la lente de cerdo introducida en una cámara

con medio de cultivo en un soporte, aunque no especifican cómo es. Por último, en el trabajo de Lei y Yao (Lei and Yao, 2006) sobre la transmisión espectral en diferentes especies, utilizan un soporte esférico realizado en cera y lleno de suero salino para cristalinos de ratón, sin especificar sus dimensiones. En otros modelos (rata, cerdo y humano) la lente es suficientemente grande como para colocarla simplemente en un cubreobjetos, cubriendo la entrada de luz a la esfera integradora del espectrofotómetro (Lei and Yao, 2006); en este trabajo, el rayo de luz del aparato de medida entra verticalmente atravesando la muestra, al contrario que en nuestro estudio, donde la luz atraviesa de forma horizontal.



**Figura 35.-** Portacristalinos utilizado en el estudio. Se observa cómo el cristalino de la izquierda ha sido irradiado con UV, mientras que el de la derecha permanece intacto.

Nuestro modelo permite que sólo haya aire entre la luz y el cristalino, de manera que la transmisión es totalmente del cristalino y no hay que hacer ajustes de medida ni aproximaciones.

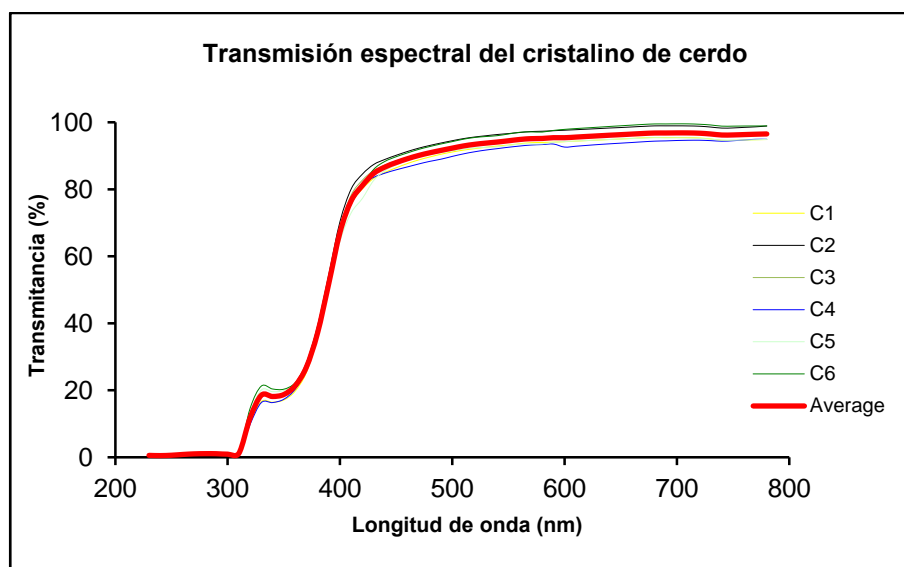
## 5.2. CONSERVACIÓN DE LOS CRISTALINOS

En la bibliografía son escasos los estudios que abordan los medios de conservación de los cristalinos; no así en córneas, en donde se ha investigado ampliamente esta cuestión debido al auge de los trasplantes. En medicina humana, los cristalinos generalmente se extraen por patología asociada y se desechan; sólo cuando se trata de una investigación como la nuestra (*in vitro*) y en diferentes momentos, se plantea esta cuestión.

Por ello, nuestro primer objetivo fue analizar diferentes tipos de conservación, con el objeto de conocer si afectaban a la transmisión espectral y emplear el más adecuado en nuestro caso.

### 5.2.1. Cristalino recién extraído o “en fresco”

Un cristalino recién extraído que se quiere conservar durante un pequeño lapso de tiempo (un par de horas por ejemplo), se puede mantener en suero salino fisiológico sin alterar sus propiedades. La transmisión espectral medida en estas condiciones será pues la real. La Figura 36 muestra la curva de transmisión espectral medida en el intervalo de 230 a 780 nm (Visible, UVA y UVB), para seis cristalinos recién extraídos.



**Figura 36.-** Transmisiones espectrales de 6 cristalinos de cerdo recién extraídos y conservados durante pocos minutos en suero fisiológico, así como su media.

Con objeto de analizar la dispersión de estas curvas, calculamos para 8 longitudes de onda representativas del espectro visible (350, 400, 450, 500, 550, 600, 650 y 700 nm) el valor promedio y la desviación estándar (SD) de los valores correspondientes a las curvas de transmisión espectral de los seis cristalinos medidos. La Tabla 1 muestra estos resultados, donde puede observarse que el cristalino del cerdo deja pasar prácticamente toda la radiación visible.

Longitud de onda (nm)		350	400	450	500	550	600	650	700
Transmisión (%)	Cristalino 1	17,09	65,77	86,42	91,13	93,20	94,21	95,02	95,46
	Cristalino 2	19,15	70,33	90,14	94,51	96,63	97,63	98,44	98,94
	Cristalino 3	18,55	68,49	88,48	92,58	94,89	95,81	96,66	97,17
	Cristalino 4	17,31	67,47	85,81	89,82	92,55	92,60	93,77	94,56
	Cristalino 5	19,93	64,47	87,29	91,49	93,09	94,25	95,01	95,34
	Cristalino 6	20,31	66,35	89,72	94,23	96,51	97,89	98,96	99,54
	<b>Media</b>	<b>18,72</b>	<b>67,14</b>	<b>87,98</b>	<b>92,29</b>	<b>94,48</b>	<b>95,40</b>	<b>96,31</b>	<b>96,84</b>
	SD	1,33	2,08	1,77	1,84	1,80	2,09	2,07	2,06

**Tabla 1.-** Transmisión espectral medida en tanto por cien, para siete longitudes de onda del espectro visible y UVA, de los seis cristalinos de cerdo recién extraídos. (SD = desviación estándar)

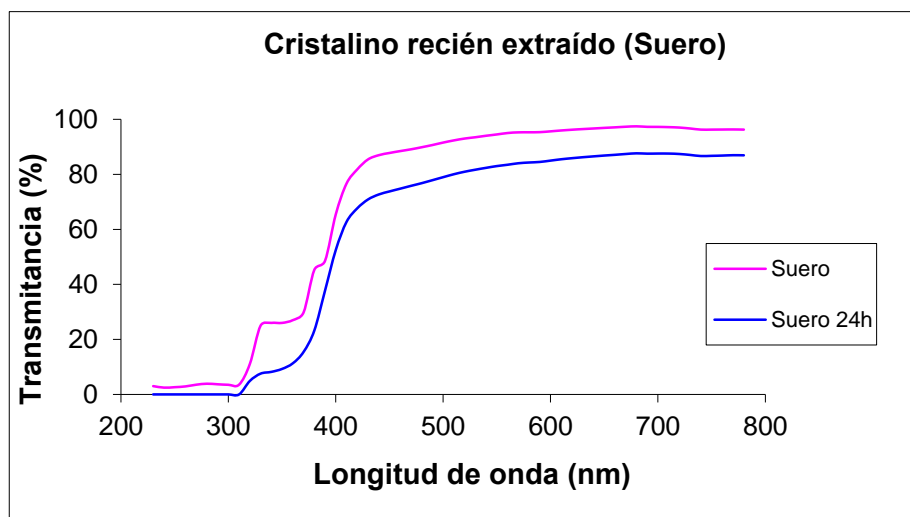
En longitudes de onda mayores a 500 nm, la transmisión es superior al 90%, siendo la desviación estándar muy baja y de la misma magnitud a lo largo de todo el espectro. Por debajo de 500 nm la transmisión comienza a disminuir, siendo esta disminución muy acusada a partir de 400 nm. Por esta razón se puede afirmar que el cristalino del cerdo es, en lo que respecta a la transmisión de luz, básicamente un filtro de corte que transmite el espectro visible y filtra prácticamente todo el UV. De hecho, se observa en la figura 36 entre 310 y 360 nm una tabla de transmisión del UV de alrededor del 15%, es decir, que el cristalino de cerdo deja pasar un poco de UV, como más adelante veremos y discutiremos en el apartado de transmisión espectral del cristalino de cerdo.

Existen estudios que realizan mediciones de transmisión espectral en fresco, como por ejemplo el trabajo de Lei y Yao (Lei and Yao, 2006), en el que se realizan mediciones a los 60 minutos de sacrificar a distintos animales y extraerles el cristalino. Sin embargo,

estos autores no dan importancia a la conservación adecuada de la lente y no realizan un estudio comparativo al respecto.

### 5.2.2. Conservación de cristalinos en suero salino fisiológico

No existen estudios previos sobre la transmisión en los cristalinos conservados en SSF. Por ello, comprobamos si es posible conservar durante un tiempo el cristalino de cerdo en SSF sin que se modifique su transparencia, midiendo la transmisión espectral de tres cristalinos inmediatamente tras su extracción y tras 24 horas en SSF. La Figura 37 muestra la transmisión espectral promedio de los tres cristalinos, siendo la SD siempre menor de 2 unidades (en % de transmisión) para cualquier longitud de onda.



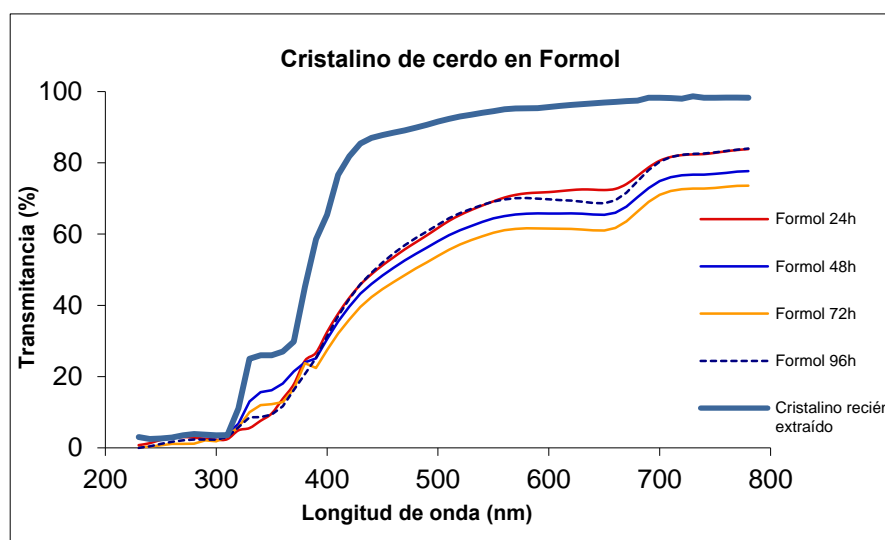
**Figura 37.-** Transmisión espectral del cristalino de cerdo recién extraído (Suero) y después de 24 horas conservado en suero fisiológico (Suero 24h).

Después de 24 horas en SSF se observa macroscópicamente el deterioro y la pérdida de consistencia del cristalino, pero aún es posible medir su transmisión ya que todavía no se ha descompuesto. En la Figura 37 observamos que la forma de la curva es muy similar en cuanto a la forma a la medida realizada inmediatamente después de la extracción. Sin embargo, la diferencia entre las dos curvas es estadísticamente significativa para todas las longitudes de onda superiores a 320 nm ( $p < 0,001$ ).

### 5.2.3. Conservación del cristalino en formol.

No existen estudios previos sobre la transmisión en los cristalinos conservados en formol. Existe un trabajo en el que se observan cambios fisiológicos a nivel de estructura celular en cristalinos sumergidos en formalina al 10% durante 24 horas y posteriormente fijados con paraformaldehído durante 48 horas; los autores consideran que este protocolo es efectivo para preservar el cristalino a nivel celular, pero no hablan de su transparencia (Mohamed et al., 2013).

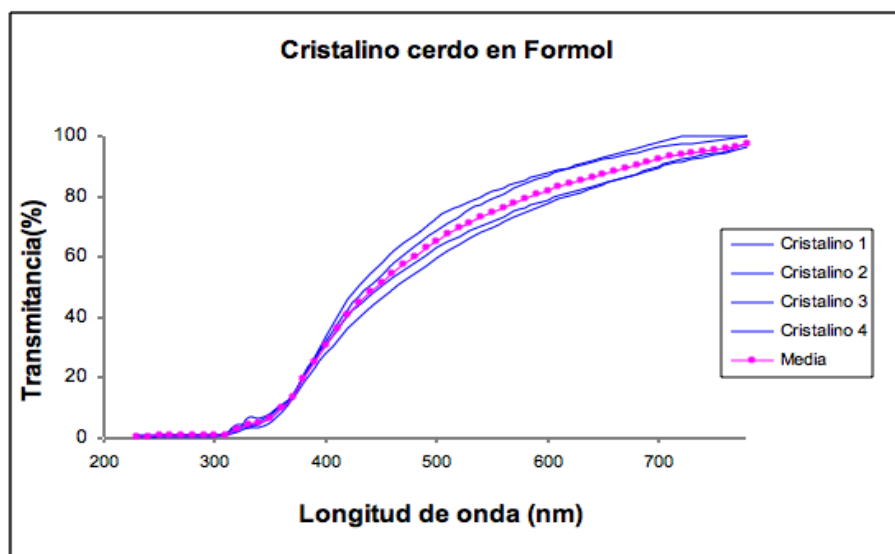
Para analizar cómo afecta el formol a la transmisión espectral de un cristalino de cerdo, sumergimos tres cristalinos en formol inmediatamente después de la extracción durante 24 h, realizando diferentes medidas. Como se muestra en la Figura 38, el formol afecta a la transmisión espectral del cristalino del cerdo, ya que las diferencias de las curvas superan con mucho el valor de la SD (que era inferior a 2 unidades). Entre el cristalino recién extraído y el conservado en formol 24 h la diferencia es significativa ( $p < 0,001$ ). Por un lado, disminuye en general la transmisión, pero además esta disminución no es igual en todo el espectro, siendo más acusada en las longitudes de onda cortas (por debajo de 500 nm aproximadamente), es decir en los azules lo que quiere decir que al disminuir su transmisión en el azul el cristalino, además de perder su transparencia, se amarillea.



**Figura 38.-** Transmisión espectral del cristalino de cerdo conservado en formol 24h en función del tiempo de conservación.



En cuanto al efecto del tiempo, se puede observar que a las 48 horas la curva disminuye ligeramente manteniendo su forma, y continúa disminuyendo a las 72 horas. Sin embargo, a las 96 horas la curva viene a ser igual que la correspondiente a las 24 horas, por lo que deducimos que en este intervalo de tiempo las variaciones observadas están dentro del error de la medida. En el intervalo de 96 horas el amarilleamiento del cristalino se produce en las primeras 24 horas, no variando prácticamente en las siguientes 72 horas. Asimismo, determinamos la transmisión espectral de cuatro cristalinos de cerdo mantenidos 48 horas en formol, para comprobar su amarilleamiento. Los resultados pueden verse en la Figura 39, donde si lo comparamos con un cristalino recién extraído, a partir de 320 nm la  $p < 0,001$ . Por todo ello concluimos que para la medida de la transmisión espectral, el formol no es un buen conservante.

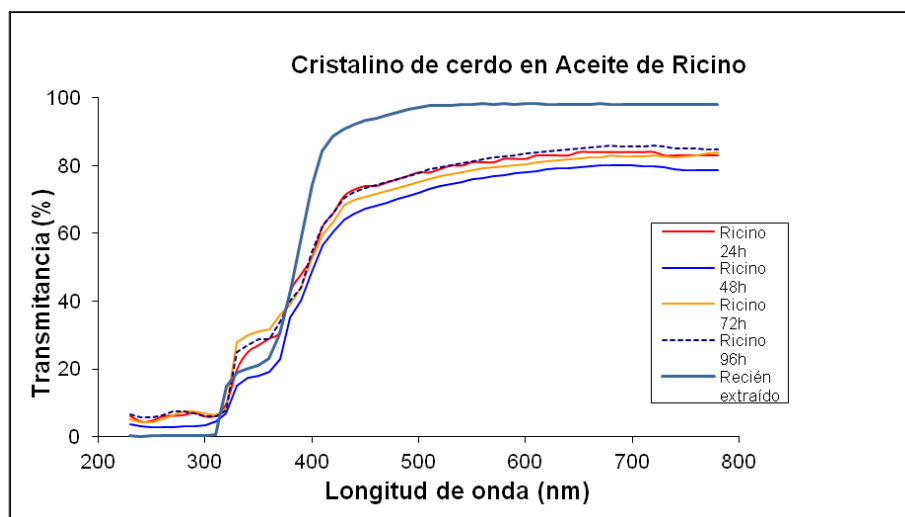


**Figura 39.-** Transmisiones espectrales de cuatro cristalinos de cerdo medidas 48 horas después de haber estado sumergidos en formol. Mostramos también la media correspondiente.

#### 5.2.4. Conservación del cristalino en aceite de ricino (*Castor Oil*)

La conservación en aceite de ricino ha sido empleada particularmente para preservar la transmisividad del cristalino. Por ejemplo, Weale (Weale, 1983) afirma en sus estudios que el cristalino humano conservado en aceite de ricino no se ve afectado en su transparencia hasta 7 semanas post-mortem. Con el objeto de corroborar estos resultados, analizamos con nuestras propias condiciones de medida cómo afecta a la transmisión espectral del cristalino su conservación en aceite de ricino. Para ello, sumergimos en aceite

de ricino 3 cristalinicos de cerdo recién extraídos, midiendo la transmisión espectral a las 24, 48, 72 y 96 horas. La Figura 40 muestra el resultado promedio, donde se observa que las formas de las curvas son similares a la del cristalino recién extraído, aunque no llegan a la transmisión de este último, alcanzando como mucho el 80% de transmisión.



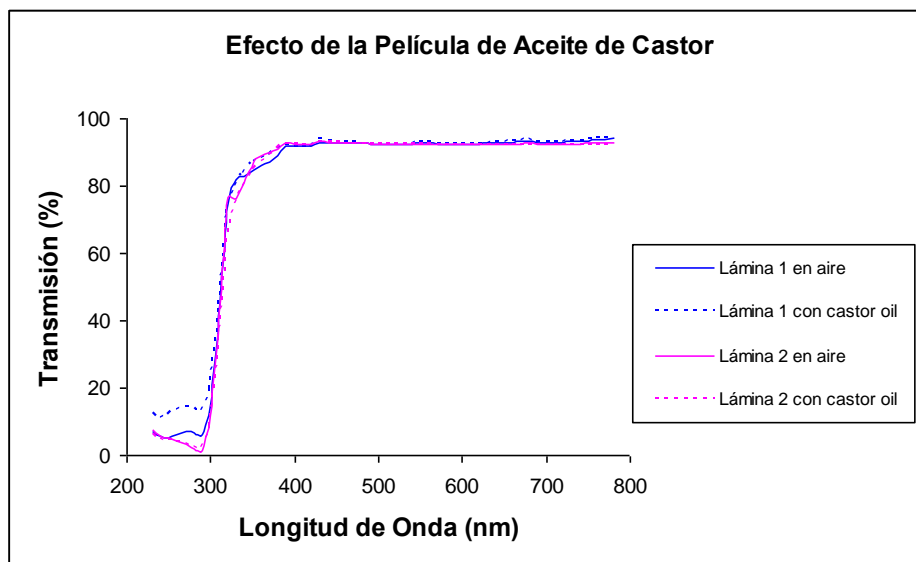
**Figura 40.-** Transmisión espectral del cristalino de cerdo conservado en aceite de ricino en función del tiempo de conservación.

En cuanto al efecto del tiempo en la conservación, puede observarse que en este caso no se producen variaciones significativas, ya que la curva correspondiente a la medida realizada 96 horas después de estar sumergido en aceite de ricino se superpone prácticamente a la correspondiente a las 24 horas, estando pues todas las curvas comprendidas dentro del error experimental.

De estos resultados podemos deducir que el aceite de ricino, en lo que respecta a la transmisión espectral, conserva aceptablemente bien el cristalino, por lo menos hasta las 96 horas. Sin embargo, hay que tener en cuenta que aunque la forma de la curva se mantiene prácticamente igual que la del cristalino recién extraído, no llega a transmitir más del 80% en el espectro visible, lo que quiere decir que pierde algo de transmisividad. Esta pérdida de transmisividad podría deberse a la película de aceite que queda adherida en ambas caras del cristalino cuando se extrae del recipiente donde está sumergido en aceite. Si esto fuera así, el aceite de ricino sería un conservante ideal, pues sólo habría que restarle a las curvas de transmisión obtenidas, el efecto de esta película de aceite.

Para corroborar este supuesto, medimos la transmisión espectral a través de una lámina de vidrio de 0.1 mm de espesor situada en el portacristalinos. A continuación sumergimos dicha lámina en aceite de ricino, de forma que al extraerla se quede adherida una fina película de aceite en ambas caras de la lámina, y repetimos la medida; la diferencia entre las dos curvas nos informará del efecto que la película de aceite tiene sobre la transmisión espectral.

La Figura 41 muestra que prácticamente no existe diferencia entre la lámina en aire y la lámina con película de aceite de ricino, sobre todo en el intervalo del espectro visible (400 a 780 nm), en el que la diferencia es nula. De ello deducimos que la fina película de aceite que queda adherida al cristalino no tiene influencia en los resultados, y no explica la disminución en la transmisión del cristalino de cerdo conservado en aceite de ricino.

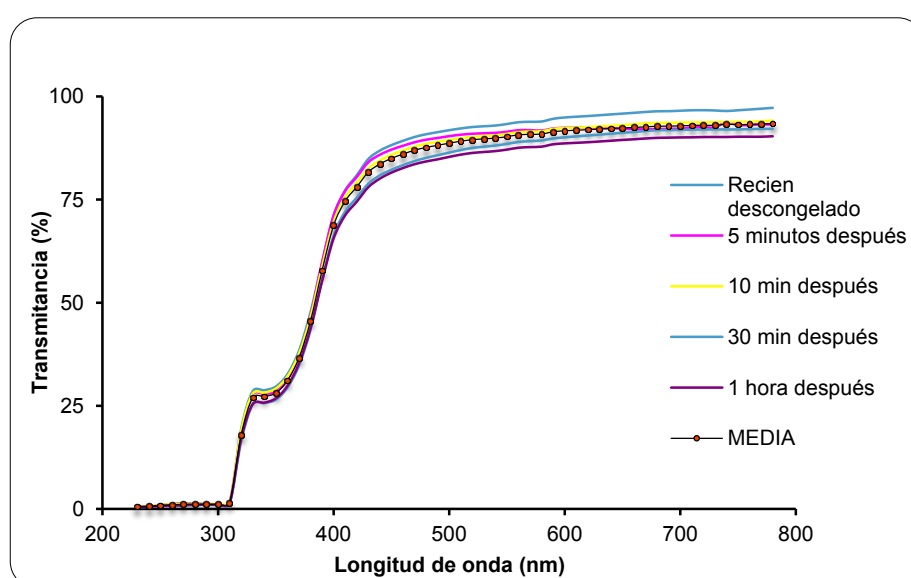


**Figura 41.-** Transmisión espectral de dos láminas de vidrio de 0.1 mm de espesor, medidas en aire y con una fina película de aceite de ricino en ambas caras.

En conclusión, el aceite de ricino altera sensiblemente el valor de la transmisión espectral, ya que aunque no modifica la forma de la curva disminuye en aproximadamente un 10% su transmisión total, en contraposición a lo que afirma Weale (Weale, 1983).

### 5.2.5. Conservación del Cristalino criocongelado.

Tal y como se explica en el método experimental, el proceso de criocongelación se realizó en dos pasos (inicialmente a  $-20^{\circ}\text{C}$  y posteriormente a  $-80^{\circ}\text{C}$ ), ya que una variación de temperatura excesivamente brusca podría producir daños en los tejidos (Kim et al., 2014). La transmisión espectral se midió en 3 cristalinios criocongelados durante 4 semanas, inmediatamente después de su descongelación natural a temperatura ambiente, y a los 5, 10, 30 y 60 minutos, con objeto de conocer si se producía alguna variación significativa durante el tiempo normal de manipulación en el laboratorio (Figura 42).



**Figura 42.-** Transmisión espectral de un cristalino de cerdo conservado en criocongelación durante 4 semanas a  $-80^{\circ}$ , medida en diferentes tiempos después de la descongelación.

Como puede observarse en la Figura 42, la curva es prácticamente igual a la obtenida en un cristalino recién extraído y no sufre variaciones apreciables ni estadísticamente significativas ( $p > 0,1$ ) hasta una hora tras la descongelación. Coincidimos con Douglas y Jeffery (Douglas and Jeffery, 2014) en que la criocongelación no afecta significativamente a la transmisión espectral del cristalino, por lo que es un método de conservación muy adecuado; estos autores no encontraron diferencias en la transmisión espectral de 3 cristalinios bovinos en fresco y tras 4 días criocongelados a una temperatura de  $-25^{\circ}\text{C}$ .

Por todo ello, optamos por utilizar los cristalinos de cerdo recién extraídos, y en los casos en que sea imposible utilizar la criocongelación a  $-80^{\circ}$  y descongelación a temperatura ambiente.

### 5.3. TRANSMISIÓN ESPECTRAL DE LOS CRISTALINOS

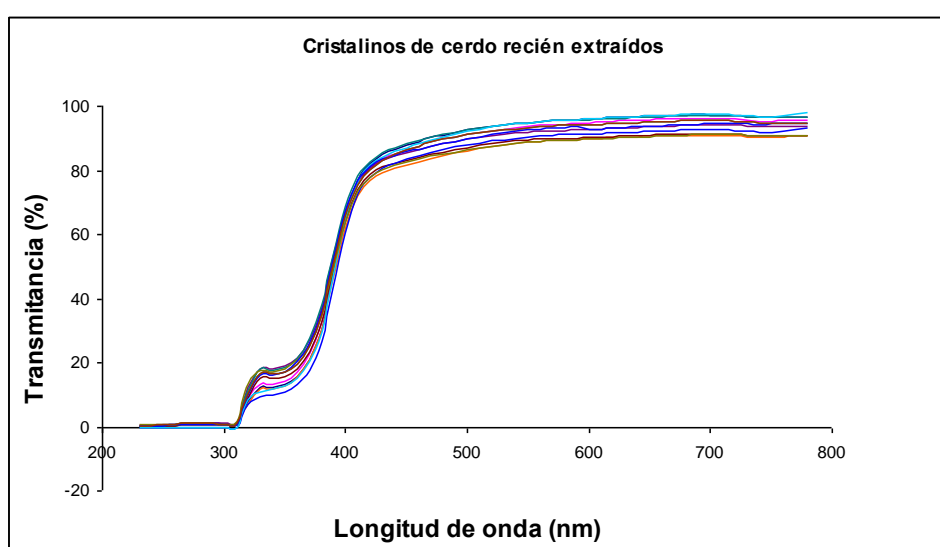
Conocer de las longitudes de onda que filtra el cristalino permite saber el grado de protección que ofrece esta estructura a la retina (Lei and Yao, 2006). Dado que la radiación UV es dañina a nivel ocular, como han descrito previamente algunos autores (Ayala et al., 2000; Dong et al., 2003; McCarty et al., 2000; Sasaki et al., 2003), los animales que no poseen visión UV deben contar con mecanismos eficientes que absorban, dispersen y protejan a la retina de las longitudes de onda de radiación UV a través de la córnea, lente y vítreo (Tsukahara et al., 2014). Del mismo modo, conocer la banda de espectro que dejan pasar y alcanzar la retina, puede aportar información sobre el tipo de visión que tiene el cerdo.

Por otro lado, como ya hemos mencionado, el ojo del cerdo se ha constituido como un importante biomodelo (Kivell et al., 2009; Middleton, 2010), por lo que es interesante conocer sus características con el mayor detalle posible, para poder realizar comparaciones y conocer hasta qué punto pueden extrapolarse a los humanos los resultados hallados en el ojo del cerdo.

La transmisión espectral del cristalino varía con la edad del individuo. Cuanto más envejece la lente, menos transmite la luz (Gaillard et al., 2000; Kessel et al., 2010; Turner and Mainster, 2008). De hecho, una lente joven transmite más del doble de luz a una longitud de onda de 450 nm que la lente de una persona mayor (Lei and Yao, 2006). No obstante, la transmisión depende de otros factores como son el estilo de vida del individuo, las horas de exposición solar, los hábitos como fumar y llevar gafas de sol o gorras, las condiciones patológicas como la diabetes y la miopía o la dieta (Artigas et al., 2012a; McCarty et al., 2000). Por ello, una de nuestras prioridades en el planteamiento del presente trabajo fue disponer de una muestra muy homogénea, en la que los cerdos tenían la misma edad, eran alimentados de igual forma, en las mismas condiciones de luz y recibían los mismos tratamientos.

En nuestro conocimiento, sólo hay dos estudios que miden la transmisión espectral del cristalino en el cerdo; en ambos casos se trata de investigaciones realizadas en varias especies, siendo el cerdo una de ellas (Lei and Yao, 2006; Tsukahara et al., 2014).

La Figura 43 muestra las curvas correspondientes a la transmisión espectral de 12 cristalinios aleatoriamente seleccionados. En la Tabla 2 se aportan los valores de transmisión para 8 longitudes de onda representativas del espectro: una que corresponde al UVA (350 nm) y 7 al espectro visible (400, 450, 500, 550, 600, 650 y 700 nm).



**Figura 43.-** Curvas de transmisión espectral correspondientes a 12 cristalinios medidos inmediatamente después de su extracción del ojo.

El test Kolmogorov-Smirnov confirma que la variable sigue una distribución normal, siendo por ejemplo  $p=0.77$  para longitud de onda 340 nm,  $p=0.64$  para 490 nm y  $p=0.86$  para 540 nm, y en general,  $p > 0.50$  para cualquier longitud de onda. Esto demuestra que no hay diferencias significativas entre la distribución de probabilidad que sigue nuestra variable aleatoria (la transmisión espectral), y la distribución normal teórica.

Longitud de onda (nm)		350	400	450	500	550	600	650	700
<b>Transmisión (%)</b>	<b>Cristalino 1</b>	13,06	64,96	87,87	92,55	94,91	96,04	96,90	97,30
	<b>Cristalino 2</b>	14,38	65,68	86,37	91,29	93,71	94,88	95,80	96,22
	<b>Cristalino 3</b>	12,94	61,72	81,75	86,20	88,79	89,75	90,65	91,01
	<b>Cristalino 4</b>	17,09	65,76	86,41	91,13	93,19	94,21	95,02	95,46
	<b>Cristalino 5</b>	18,82	67,41	85,61	89,70	91,88	92,75	93,60	94,14
	<b>Cristalino 6</b>	15,72	63,97	83,22	87,22	89,57	90,18	90,96	91,41
	<b>Cristalino 7</b>	18,54	68,49	88,48	92,58	94,89	95,80	96,65	97,16
	<b>Cristalino 8</b>	11,01	60,56	83,42	88,04	90,37	91,32	92,10	92,57
	<b>Cristalino 9</b>	12,90	64,68	87,10	92,16	94,80	96,04	96,91	97,47
	<b>Cristalino 10</b>	18,24	63,74	82,51	86,49	88,73	89,76	90,53	91,14
	<b>Cristalino 11</b>	17,30	67,47	85,81	89,82	92,55	92,60	93,77	94,56
	<b>Cristalino 12</b>	19,92	64,47	87,29	91,48	93,08	94,24	95,01	95,34
	<b>MEDIA</b>	<b>15,83</b>	<b>64,91</b>	<b>85,49</b>	<b>89,89</b>	<b>92,21</b>	<b>93,13</b>	<b>93,99</b>	<b>94,48</b>
	<b>SD</b>	<b>2,90</b>	<b>2,31</b>	<b>2,23</b>	<b>2,36</b>	<b>2,33</b>	<b>2,43</b>	<b>2,44</b>	<b>2,43</b>

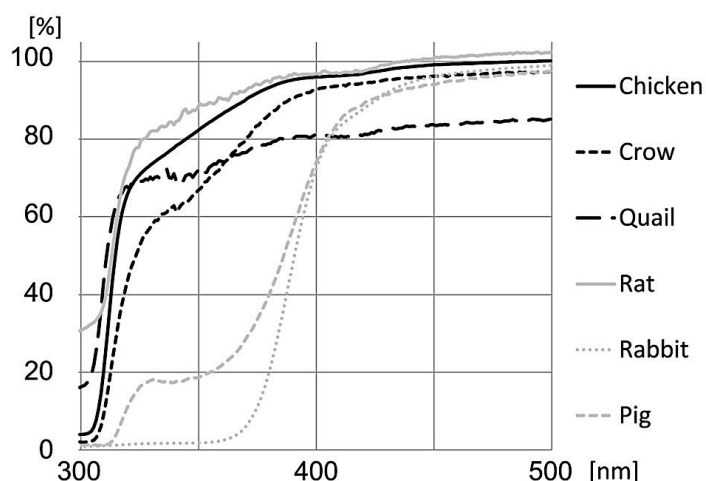
**Tabla 2.-** Transmisión espectral (%), para ocho longitudes de onda del espectro, de doce cristalinos de cerdo recién extraídos, con el valor promedio (Media) y la desviación estándar (SD).

Observamos en los resultados que el cristalino del cerdo transmite entre el 90% y el 100% dentro de la zona del visible, disminuyendo bruscamente a partir de 400 nm. En la zona del UVA (315-380 nm) deja pasar algo de radiación (oscila entre un 5% y un 20%) y a partir de 315 nm prácticamente filtra toda la radiación. Por todo ello podríamos confirmar que el cristalino del cerdo es más o menos un filtro de corte que deja pasar el visible, filtra aceptablemente el UVA y no deja pasar en absoluto el UVB ni el UVC, tal y como ya han descrito para esta especie otros autores (Lei and Yao, 2006; Tsukahara et al., 2014).

Podemos constatar que el cristalino del cerdo presenta una banda de transmisión en el ultravioleta cercano (UVA), alcanzando una transmisión de alrededor de un 15% de media en 350 nm (Figura 43); estos resultados coinciden con los obtenidos por Lei y Yao (Lei and Yao, 2006), que describen que la lente transmite aproximadamente un 20% a 360 nm. Estos autores midieron la transmisión de 8 lentes de cerdos de 4 meses de edad, comprobando que el cristalino transmitía el 50% de la luz en 375 nm, lo cual se aproxima a

nuestros datos, puesto que la media de transmisión para 350 nm es 15,83% y para 400 nm es 64,91%, como puede comprobarse en la tabla 2.

Tsukahara y sus colaboradores (Tsukahara et al., 2014) midieron la transmisión de UVA y parte del espectro visible de la córnea, lente y vítreo en pollos, cuervos, codornices, ratas, conejos y cerdos; específicamente se midieron 4 lentes de cerdos jóvenes, de edades comprendidas entre los 5 y 7 meses de edad. Tal y como se observa en la figura 44, estos autores describen que la lente de cerdo transmite poco en el UVA (315-400), y por tanto absorbe gran parte de esta radiación, lo que coincide con nuestros resultados; obtenemos una curva de transmisión de UVA muy similar (Figura 43), y observamos que la transmisión decrece rápidamente desde los 410 nm hacia longitudes de onda menores, y permanece sobre el 50% de 390 nm a los 410 nm.



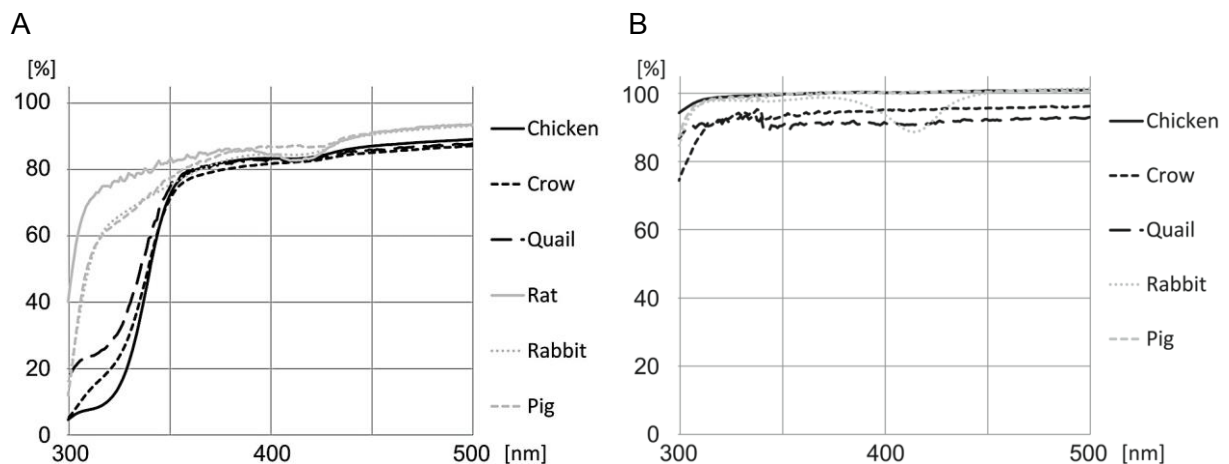
**Figura 44.** Media de la transmisión espectral de las lentes de pollo (*Chicken*, en inglés), cuervo (*Crow*, en inglés), codorniz (*Quail*, en inglés), rata (*Rat*, en inglés), conejo (*Rabbit*, en inglés) y cerdo (*Pig*, en inglés). El eje vertical representa la transmisión en %, el eje horizontal representa las longitudes de onda en nm (Tsukahara et al., 2014).

Nótese en la figura 44, que la transmisión en aves de diferentes tipos deja pasar gran parte del UVA, lo cual es consecuente con su visión del ultravioleta. Así mismo lo es la visión de la rata, que transmite mejor la radiación UVA que las aves utilizadas en este estudio.

Tsukahara y sus colaboradores (Tsukahara et al., 2014) establecen además en su trabajo unos valores de transmisión para los demás medios oculares (córnea y vítreo) en el



cerdo, que a su vez son muy similares a los realizados por Boettner y Wolter en 1962 en ojos humanos (Boettner and Wolter, 1962). La córnea del cerdo, conejo y la rata deja pasar prácticamente todo el UVA; sin embargo se observa que en las aves sí hay parte de absorción corneal, hasta 350 nm. El vítreo no filtra prácticamente nada de UVA, como puede verse en la figura 45.



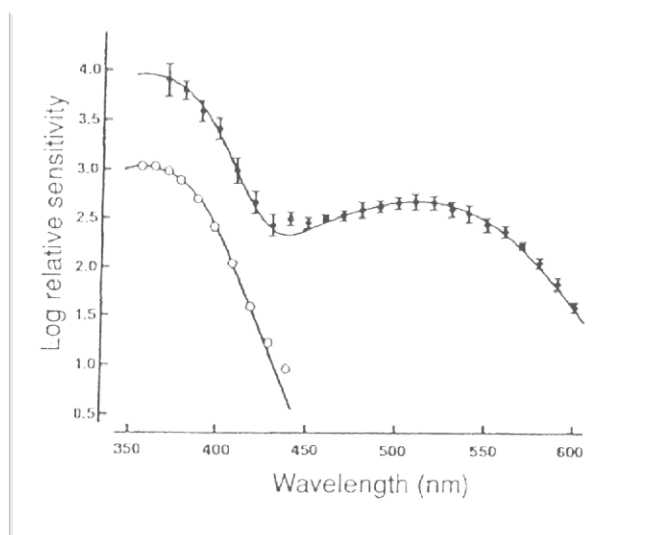
**Figura 45.** Media de la transmisión espectral de la córnea (A) y el vítreo (B) del pollo (*Chicken*, en inglés), cuervo (*Crow*, en inglés), codorniz (*Quail*, en inglés), rata (*Rat*, en inglés), conejo (*Rabbit*, en inglés) y cerdo (*Pig*, en inglés). El eje vertical representa la transmisión en %, el eje horizontal representa las longitudes de onda en nm (Tsukahara et al., 2014).

Nuestros resultados reflejan que en el espectro visible la retina del cerdo recibe toda la luz del espectro solar, lo que corrobora el hecho ya conocido de que es un animal diurno. Por otro lado se demuestra que el cristalino deja pasar un 15% de la radiación UVA de la luz solar, por lo que es posible que la retina del cerdo sea capaz de detectar algo en el UV cercano.

Para poder realizar esta afirmación, se necesitaría conocer los espectros de acción de los fotorreceptores de la retina, tanto de conos como de bastones, para saber hasta qué punto la retina del cerdo es sensible a la radiación UV cercana, y por consiguiente poder afirmar que el cerdo detecta en la región del UV cercano. En la bibliografía existen diferentes estudios sobre la densidad y distribución espacial de los fotorreceptores de la retina del cerdo y de la especie humana (Chandler et al., 1999; Hendrickson and Hicks, 2002). La densidad total de fotorreceptores en la retina del cerdo oscila entre 83.000 y 200.000 células/mm<sup>2</sup>, con una media de 138.000 células/mm<sup>2</sup>. La densidad de conos varía

entre 39.000 (área central) y 8.500 conos/mm<sup>2</sup> (periferia), con una media de 16.400 conos/mm<sup>2</sup>. La relación bastones/ conos es de 3:1 en el área central y de 16:1 en la periferia, con una relación media de 8:1, existiendo una densidad mayor en la parte inferior central de la retina; la densidad de conos decrece gradualmente del centro a la periferia. En la retina humana existe en el centro de la fovea una densidad de conos que oscila entre 150.000 conos/mm<sup>2</sup> y 180.000 conos/mm<sup>2</sup>, bajando en la periferia de la retina a unos 6000 conos/mm<sup>2</sup>. Los bastones tienen un pico de densidad de 150.000 bastones/mm<sup>2</sup> bajando en la periferia hasta 30.000-40.000 bastones/mm<sup>2</sup>. En definitiva, existe una gran similitud entre el mosaico de fotorreceptores de la retina del cerdo y la humana (Chandler et al., 1999; Hendrickson and Hicks, 2002; Jonas et al., 1992), lo que hace de la retina del cerdo un modelo idóneo para la investigación del ojo humano.

En cuanto a la sensibilidad espectral de la retina, se tiene constancia desde hace tiempo de la capacidad de muchos animales para ver en la región del ultravioleta. La alta sensibilidad a esta luz constituye un aspecto fundamental de la visión en muchos invertebrados (Salcedo et al., 2003; Stark and Tan, 1982). Entre los vertebrados hay algunos anfibios, pájaros y peces que tienen una retina sensible al UV cercano (Douglas, 1986; Emmerton et al., 1980; Goldsmith, 1980; Hawryshyn and Beauchamp, 1985; Tsukahara et al., 2014), gracias a un tipo de conos que contienen un pigmento sensible al UV (Bowmaker, 2008; Harosi and Hashimoto, 1983; Perry and McNaughton, 1991). Aunque se pensaba que este tipo de fotorreceptores no existían en los ojos de los mamíferos, Jacobs y sus colaboradores ya en 1991 (Jacobs et al., 1991) demostraron que algunos roedores poseían un mecanismo retiniano que les otorgaba un máximo de sensibilidad en la región del UV, tal y como luego comprobaron Tsukahara *et al* (Tsukahara et al., 2014). Jacobs *et al* (Jacobs et al., 1991) midieron la sensibilidad espectral de ratones comunes (*Mus musculus*) mediante electroretinogramas (ERG) (Figura 46).



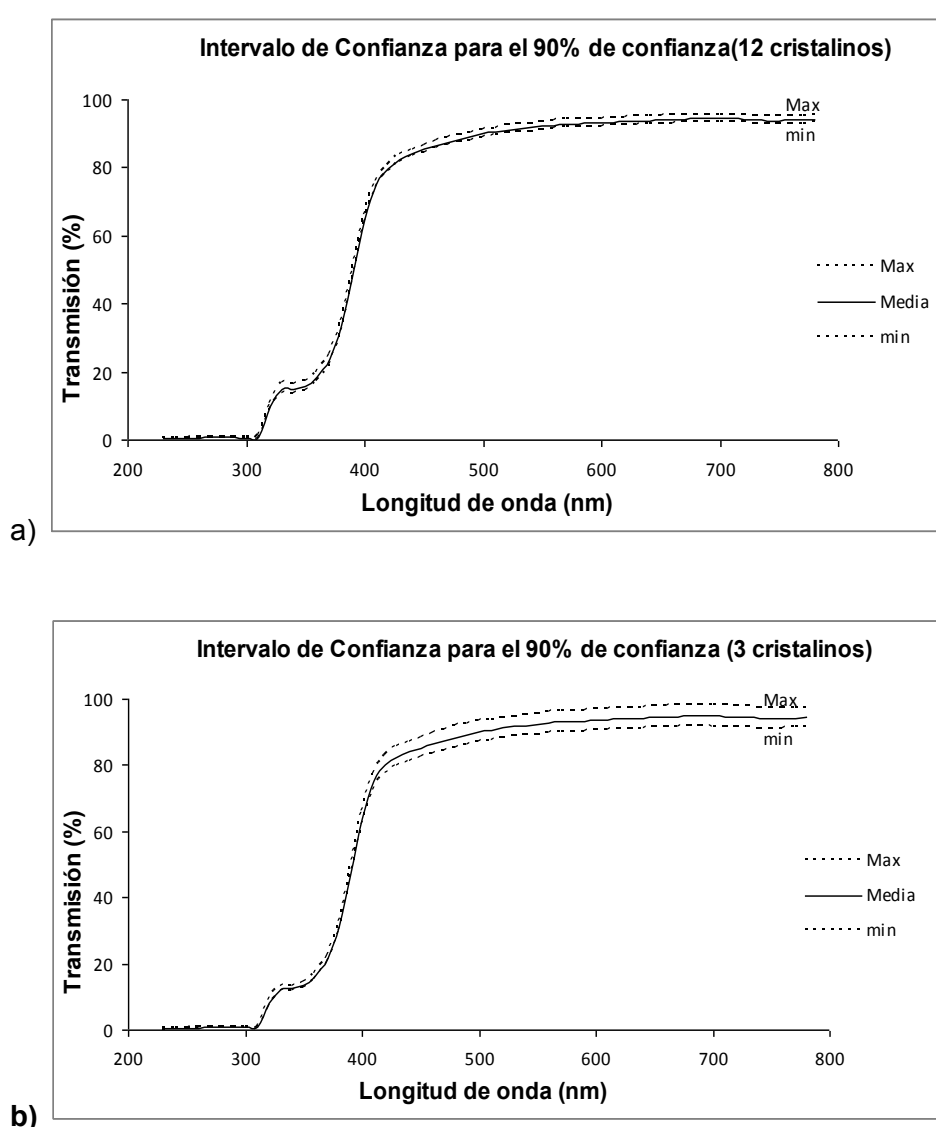
**Figura 46.-** Funciones de sensibilidad espectral para ratones. Curva superior obtenida mediante ERG registrado con fotometría de parpadeo. Curva inferior obtenida adaptando el ojo a longitudes de onda largas (Figura obtenida de Jacobs et al, 1991).

En la figura anterior los puntos superiores representan la sensibilidad media de 5 ratones y la línea que los une la media, donde se aprecia que hay dos máximos de sensibilidad, uno en la zona del visible (aproximadamente en 530 nm) y otro en el UV cercano (aproximadamente en 360 nm). La curva inferior (círculos abiertos), muestra la función de sensibilidad medida cuando el ojo está adaptado a la luz de larga longitud de onda y representa la media de 5 ratones. Esta última curva también muestra un máximo de sensibilidad en el UV cercano.

Neitz y Jacobs (Neitz and Jacobs, 1989) estudiaron la sensibilidad espectral de los conos en ungulados y más concretamente analizaron la retina del cerdo doméstico (*Sus scrofa*). Estos autores utilizan la misma técnica descrita anteriormente de ERG por fotometría de parpadeo, concluyendo que la retina del cerdo tiene un tipo de cono que responde a las largas longitudes de onda, con un máximo de sensibilidad en 550 nm y otros que responden frente a longitudes de onda cortas, situando su máximo espectral aproximadamente en el rango de 440-490 nm. Sin embargo, en este estudio no se hace referencia a la sensibilidad en la región del UV.

Por tanto, no podemos afirmar si los cerdos son capaces de ver en el ultravioleta cercano, sólo podemos afirmar, de acuerdo con nuestros resultados y la bibliografía, que su cristalino joven deja pasar alrededor de un 15% la radiación UVA presente en la luz solar.

La siguiente figura (Figura 47 a y b) muestra la media y el intervalo de confianza para el 90% de confianza obtenido para las curvas de transmisión correspondientes a los 12 cristalinos, anteriormente descritas. Ya que las desviaciones estándar eran pequeñas para todas las longitudes de onda, se investigó si tres medidas serían suficientes para establecer una curva de transmisión (Figura 3b). Encontramos que no existían diferencias significativas entre medir un número de doce cristalinos o de tres, siendo  $p=0.74$  como media ( $p$  varía entre 0.25 y 0.99 para las diferentes longitudes de onda). Por ello, consideramos en adelante que un tamaño muestral de 3 cristalinos es adecuado para obtener unos resultados consistentes.

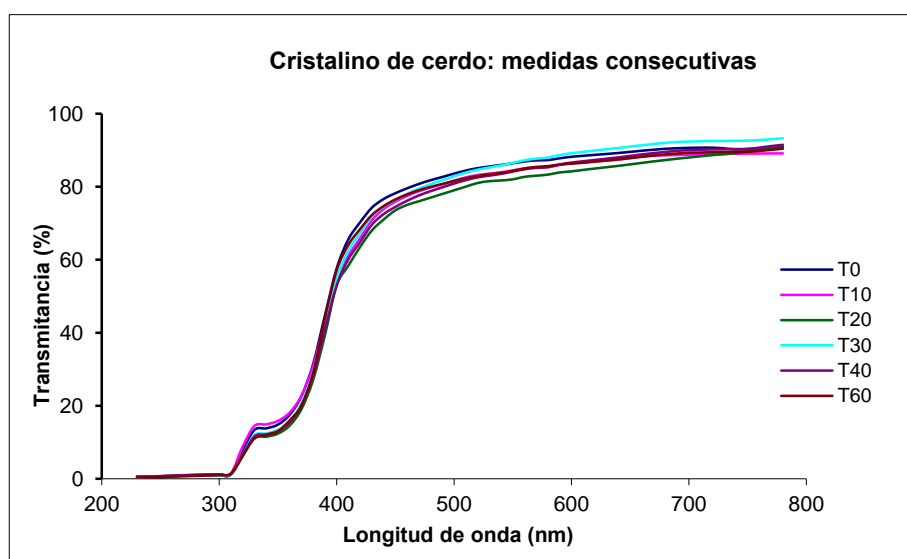


**Figura 47.-** Transmisión espectral del cristalino de cerdo común. Media e Intervalo de confianza (Max y Min) de doce (a) y tres (b) cristalinos.

Con el objetivo de saber hasta qué punto nuestros resultados son extrapolables a la especie humana, revisamos la bibliografía para comparar las curvas de transmisión de ambas especies. En nuestro estudio hemos utilizado cristalinos jóvenes, de cerdos de 6 meses de edad. Tal y como hemos puntualizado anteriormente, la edad es un factor influyente en la transmisión (Gaillard et al., 2000; Kessel et al., 2010; Turner and Mainster, 2008). De hecho, en un trabajo que medía la variación de transmisión en el espectro visible de lentes de personas entre 18 a 76 años, se observó que la variabilidad con la edad en la transmisión para longitudes de onda cortas (400 a 450 nm) era un 90%, mientras que para longitudes de onda más largas (630-700 nm), sólo variaba un 13% (Kessel et al., 2010). Por lo tanto, para conseguir resultados fiables se deben utilizar cristalinos de individuos con edades similares. Sólo un estudio (Boettner and Wolter, 1962), realiza medidas en niños de edades comprendidas entre las 4 semanas de vida y los 4 años, observando que la transmisión del cristalino en menores de 5 años empezaba a incrementarse rápidamente a partir de 390 nm, alcanzando un 90% a los 450 nm; sin embargo, en la lente adulta este incremento es mucho menor, no llegando al 90% de transmisión hasta 540 nm. Nuestros resultados se aproximan mucho a los obtenidos por estos autores, ya que la lente de cerdo joven transmite de media un 85,49% a 450 nm (Artigas et al., 2012a).

#### *Variaciones en el tiempo*

La siguiente figura muestra las curvas de transmisión correspondientes a la media de 3 cristalinos, medidas cada 10 minutos durante 1 hora, con objeto de evaluar si no se produce un deterioro del cristalino apreciable en ese intervalo que pudiera afectar a su transmisión ( Figura 48). Además, para analizar la dispersión de las curvas, se calculó para 8 longitudes de onda representativas del espectro, el valor promedio (Media) y la desviación estándar (SD) de los valores de transmisión (Tabla 3).



**Figura 48.-** Transmisión espectral de un cristalino de cerdo medido 6 veces consecutivas durante una hora.

Longitud de onda (nm)		350	400	450	500	550	600	650	700
Transmisión (%)	T0	14,85	57,58	78,20	83,57	86,4	88,17	89,53	90,62
	T10	15,86	54,53	75,88	81,66	84,45	86,39	87,79	88,77
	T20	12,37	53,08	73,50	78,21	81,65	84,19	86,10	88,00
	T30	13,41	54,76	76,43	82,83	86,50	89,16	90,97	92,33
	T40	13,08	52,90	74,45	80,85	84,12	86,60	88,42	90,02
	T60	13,05	57,05	76,48	81,53	84,31	86,31	87,84	89,30
	Media	<b>13,77</b>	<b>54,98</b>	<b>75,82</b>	<b>81,44</b>	<b>84,57</b>	<b>86,80</b>	<b>88,44</b>	<b>89,84</b>
	SD	<b>1,31</b>	<b>1,96</b>	<b>1,65</b>	<b>1,86</b>	<b>1,78</b>	<b>1,71</b>	<b>1,66</b>	<b>1,52</b>

**Tabla 3.-** Valores de la transmisión espectral (%), para ocho longitudes de onda del espectro, del cristalino de cerdo medido 6 veces durante una hora. Media y desviación estándar (SD).

Nuestros resultados muestran que la curva mantiene unos valores bastante constantes con una desviación estándar baja. Las SD de estas curvas toman valores menores a 2.0, las cuales son similares o menores que la SD obtenida para la variabilidad entre elementos, es decir para las doce curvas mostradas en la Figura 43. En definitiva, si no se ejerce ninguna acción sobre el cristalino, la curva de transmisión no sufre ninguna modificación significativa a lo largo de por lo menos una hora.

#### **5.4. EFECTO DE LA RADIACIÓN ULTRAVIOLETA SOBRE EL CRISTALINO DEL CERDO**

En este apartado analizaremos los resultados obtenidos en nuestro estudio sobre la influencia de las radiaciones UVA y UVB a diferentes intensidades y tiempos en el cristalino de cerdo, y lo discutiremos con la bibliografía existente al respecto.

Como ya vimos en la introducción, existe una correlación entre la exposición de los animales a la radiación UV y la formación de cataratas (Galichanin et al., 2010; Kim and Koh, 2011; Michael, 2000; Soderberg, 1990a; Varma et al., 2011; West, 1999). Otros autores concluyen que el amarilleamiento de las proteínas de la lente a diferentes edades se debe a cambios fotoquímicos cronológicos derivados de la exposición durante largo tiempo a radiación UV, y no al proceso normal de envejecimiento de la lente (Gaillard et al., 2000).

Las intensidades de radiación utilizadas en este estudio se determinaron en base al tiempo de exposición. Elegimos irradiar a 10 y 20 J/cm<sup>2</sup>, porque consideramos que era una potencia suficiente para provocar cambios en los tiempos marcados, y observar el efecto de la radiación en el cristalino, tal y como dictamina la ley fotoquímica de Bunsen-Roscoe formulada en 1862 y que determina que si un efecto fotoquímico depende únicamente de factores fotoquímicos, el efecto biológico de una exposición a la radiación UV depende del producto de la intensidad de radiación por el tiempo de exposición a la misma (Bunsen and Roscoe, 1862). En el caso del UVA se hicieron medidas hasta 30 minutos, sin embargo, en el caso de UVB con 20 minutos de exposición fue suficiente para ver cambios en el cristalino, tanto macroscópicamente como en la transmisión, tal y como veremos en los resultados.

#### **5.4.1. RADIACIÓN UVA**

##### ***Efecto de la radiación UVA (315-400nm) en la transmisión espectral del cristalino del cerdo***

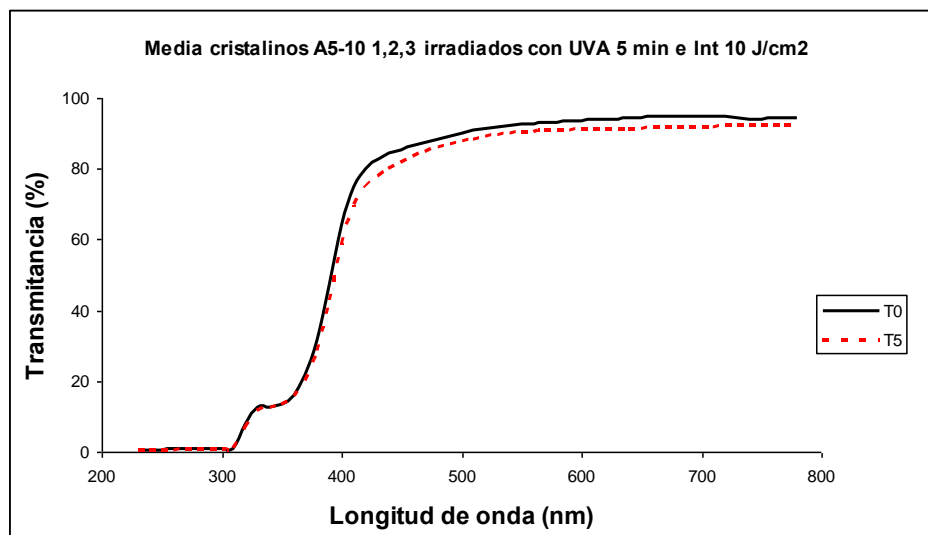
Como hemos apuntado en la introducción, si la radiación UV tiene influencia en la formación de cataratas tiene que ser debida exclusivamente a la banda de radiación comprendida aproximadamente entre 300 y 400 nm, pues es la que llega con mayor o menor intensidad a la superficie de la tierra procedente de la luz solar. Esta banda corresponde a todo el UVA (315-380 nm) y parte del UVB (300-315 nm), por lo que en nuestro dispositivo seleccionamos, para este apartado, la banda 315-400 nm que incluía todo el UVA.

A continuación veremos por apartados el efecto de la radiación UVA a 10 J/cm<sup>2</sup> en los tres tiempos seleccionados, y seguidamente los resultados en los mismos tiempos a una intensidad de 20 J/cm<sup>2</sup>. Después se analizará para cada intensidad las variaciones en la transmisión según el tiempo de exposición y comparando para cada tiempo las dos intensidades utilizadas.



- UVA
- Intensidad: 10 J/cm<sup>2</sup>
- Tiempo de exposición: 5 minutos

La siguiente figura muestra la media de las tres curvas de transmisión espectral de tres cristalinos de cerdo recién extraídos y tras irradiarlos con UVA durante 5 minutos e intensidad de 10 J/cm<sup>2</sup> (Figura 49). No existen diferencias estadísticamente significativas entre el cristalino en fresco e irradiado ( $p=0.55$ ), por lo que podemos afirmar que la transmisión del cristalino no se ve afectada a efectos prácticos por esta cantidad y tiempo de radiación.

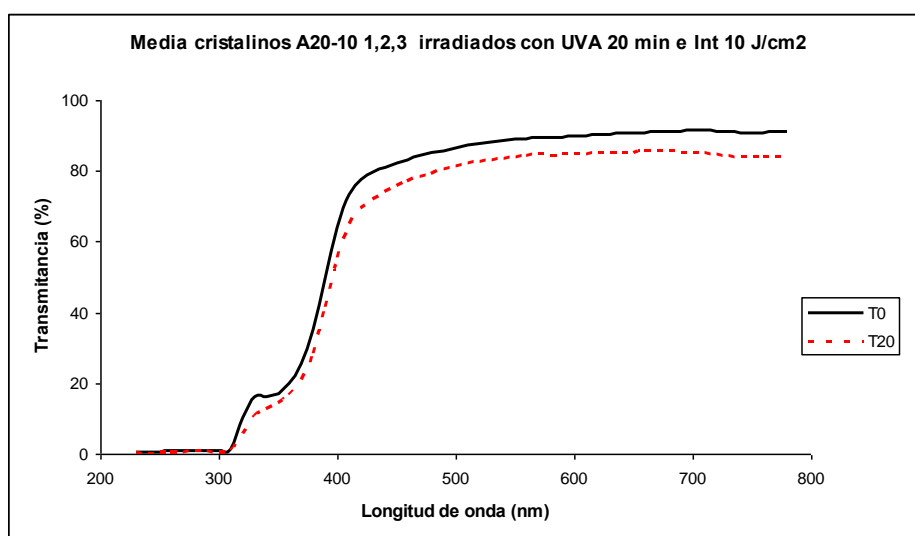


**Figura 49.-** Media de la transmisión espectral de 3 cristalinos. T0= Transmitancia del cristalino recién extraído; T5= transmitancia de los cristalinos irradiados (5 minutos, intensidad de 10 J/cm<sup>2</sup>).

- UVA

- **Intensidad: 10 J/cm<sup>2</sup>**
- **Tiempo de exposición: 20 minutos**

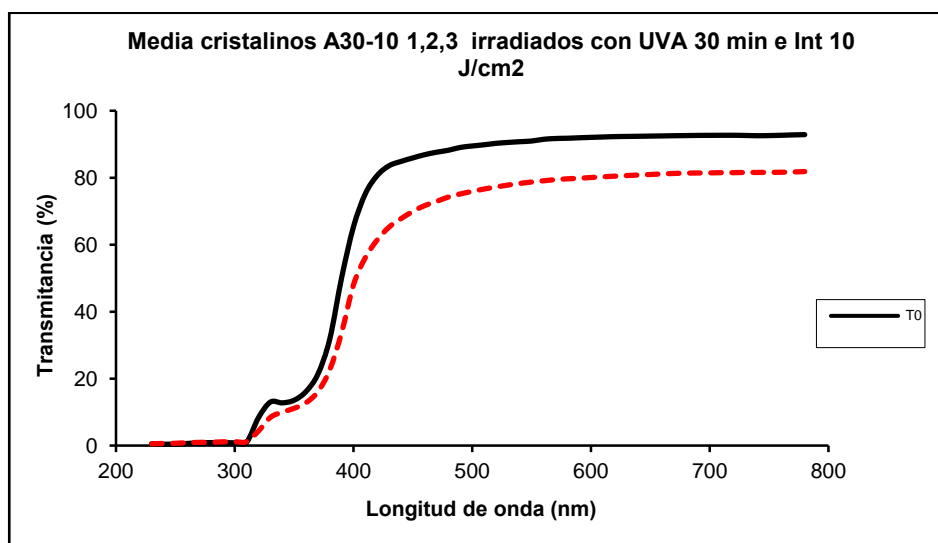
La siguiente figura muestra la media de las tres curvas de transmisión espectral de tres cristalinos de cerdo recién extraídos y tras irradiarlos con UVA durante 20 minutos e intensidad de 10 J/cm<sup>2</sup>. En este caso, las curvas representadas en la Figura 50 presentan una diferencia significativa con  $p=0.097$ .



**Figura 50.-** Media de la transmisión espectral de 3 cristalinos. T0 corresponde al cristalino recién extraído; T20 irradiado 20 minutos con UVA y una intensidad de 10 J/cm<sup>2</sup>.

- UVA
- Intensidad: 10 J/cm<sup>2</sup>
- Tiempo de exposición: 30 minutos

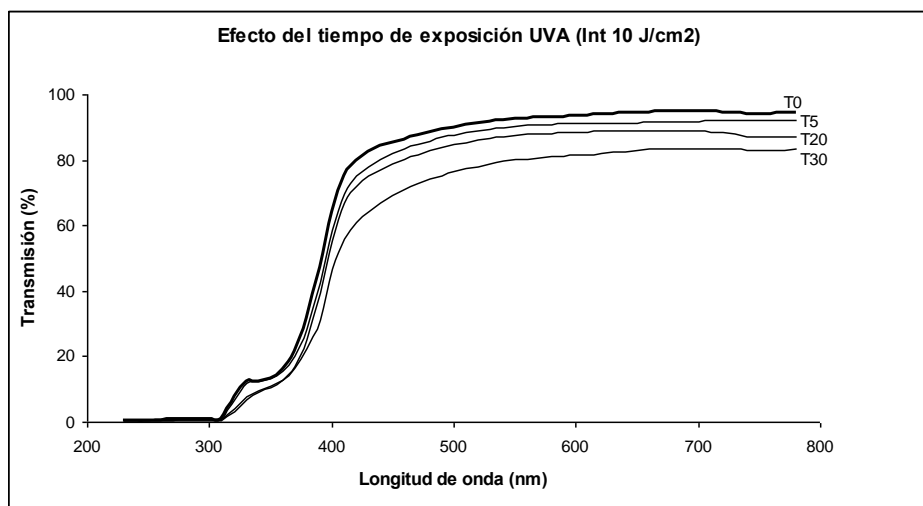
La Figura 51 es la media de tres cristalinicos, que nos muestra cómo se modifica la transmisión espectral del cristalino cuando es irradiado durante 30 minutos con radiación UVA de intensidad 10 J/cm<sup>2</sup>. La diferencia entre las curvas de la Figura 51 es estadísticamente significativa ya que  $p=0.024$ .



**Figura 51.-** Media de la transmisión espectral de 3 cristalinicos. T0 corresponde al cristalino recién extraído; T30 irradiado 30 minutos con UVA y una intensidad de 10 J/cm<sup>2</sup>.

En conjunto, para la radiación UVA a 10 J/cm<sup>2</sup> estadísticamente no existen diferencias significativas entre el cristalino no irradiado (T0) y el irradiado 5 minutos (T5) para cualquier longitud de onda ( $p=0.55$ ). Sin embargo sí que existen diferencias significativas entre el cristalino T0 y los irradiados 20 (T20) y 30 (T30) minutos. Entre T5 y T20 no hay diferencia significativa ( $p=0.24$ ), pero sí la hay entre T5 y T30 ( $p=0.07$ ). Finalmente, no existe diferencia entre T20 y T30 ( $p=0.27$ ), aunque por debajo de 420 nm  $p=0.10$  por lo que en esa franja la diferencia sí es significativa según el criterio adoptado.

En la figura 52, se resume los tiempos para UVA 10 J/cm<sup>2</sup>



**Figura 52.-** Variación de la transmisión espectral del cristalino del cerdo irradiado con radiación UVA (315-400 nm) y con una intensidad de  $10 \text{ J/cm}^2$ , para diferentes tiempos de exposición: T0 (sin irradiar); T5 (5 minutos); T20 (20 minutos); T30 (30 minutos).

En esta figura se aprecian dos hechos:

a) *Espectro visible (380-780 nm)*

En la región de la banda visible la transmisión disminuye con el tiempo de exposición de manera prácticamente uniforme, tal y como se muestra en la Tabla 4. Entre 500 y 780 nm la caída media se sitúa alrededor de un 3%, no siendo esta diferencia, como hemos dicho, estadísticamente significativa.

Longitud de onda (nm)	T5 Disminución Transmisión (%)	T20 Disminución Transmisión (%)	T30 Disminución Transmisión (%)
780	2	8	12
700	3	6	12
600	3	5	13
500	3	6	15
450	4	8	19
420	6	10	24
400	8	13	27
380	9	20	29
350	11	21	32
320	11	60	62

**Tabla 4.-** Disminución de la transmisión del cristalino del cerdo relativa a la de un cristalino recién extraído, después de 5 minutos (T5), 20 minutos (T20) y 30 minutos (T30) de ser irradiados con radiación Ultravioleta A de intensidad  $10 \text{ J/cm}^2$ , para diferentes longitudes de onda.

Después de 20 minutos de exposición, el descenso en la transmisión en el mismo intervalo se sitúa en un 6%, también de forma uniforme; y después de 30 minutos en un 13% siendo en ambos casos la diferencia con T0 estadísticamente significativa ( $p < 0.1$ ). Para la longitud de onda de 450 nm la disminución es ligeramente más pronunciada para los tres tiempos de exposición. Sin embargo es a partir de los 420 nm cuando la disminución de la transmisión se acentúa conforme disminuye la longitud de onda, pero sólo para los tiempos de exposición de 20 y 30 minutos. Con 5 minutos de exposición, la disminución de la transmisión sigue siendo muy pequeña y no significativa. Cerca del límite del espectro visible (380 nm) estas caídas son del 9% para 5 minutos de exposición, y aproximadamente un 20% para 20 minutos de exposición y un 29% para 30 minutos de exposición. Esto es indicativo de que el cristalino transmite cada vez menos luz, y que las mayores caídas en las cortas longitudes de onda (los azules) no son lo suficientemente pronunciadas como para que se evidencie un amarilleamiento del cristalino.

#### *b) Espectro UVA (320-380 nm)*

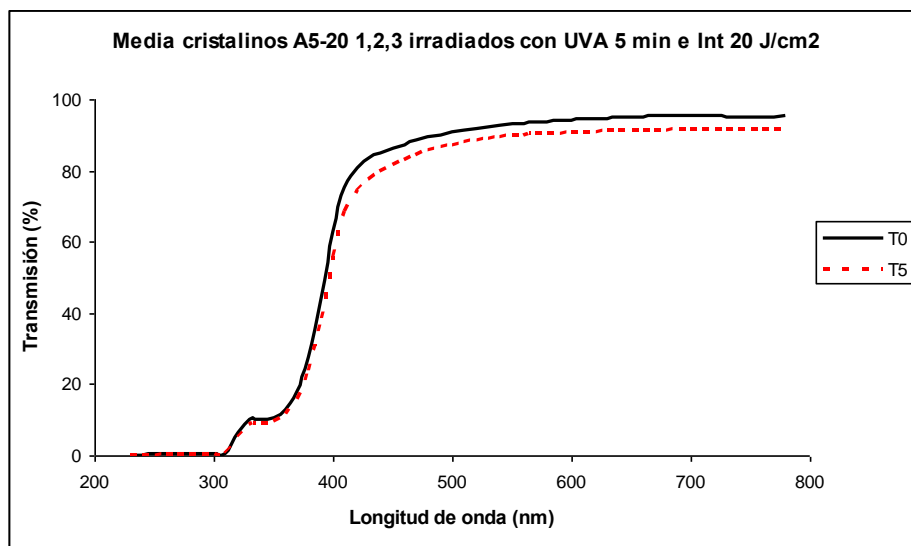
En la región del UVA, el descenso en la transmisión del cristalino (Figura 52) es mucho más acusada que en el espectro visible excepto para el caso de 5 minutos de

irradiación, donde esa disminución continúa siendo pequeña y no significativa. Por el contrario, para tiempos de exposición de 20 y 30 minutos esta disminución, claramente significativo, es de un 21% y un 32% respectivamente para la longitud de onda de 350 nm, y de alrededor de un 60% y 62% para 320 nm. Para longitudes de onda más bajas la transmisión es prácticamente cero, por lo que se puede considerar 320 nm como la longitud de onda de corte.

De todo lo anterior deducimos que la acción de la radiación UVA de intensidad  $10 \text{ J/cm}^2$  sobre la transmisión espectral del cristalino del cerdo provoca una disminución de su transmisión que se acentúa con el tiempo de exposición. Sin embargo para 5 minutos de exposición esta disminución es muy leve en todo el espectro estudiado, y no estadísticamente significativa. Para exposiciones de 20 y 30 minutos, sí se produce una disminución más acusada y significativa, pero que no es igual en todo el espectro. En el espectro visible esta disminución es más o menos uniforme, mayor por supuesto para 30 minutos de exposición, pero en la región del ultravioleta la disminución de la transmisión aumenta visiblemente y se acelera conforme nos desplazamos hacia las cortas longitudes de onda. En conclusión, la radiación ultravioleta A provoca una mayor disminución de la transmisión en las cortas longitudes de onda (los azules), pero sobre todo en el ultravioleta, de forma que la meseta de transmisión que el cristalino del cerdo presenta en la región del ultravioleta va desapareciendo conforme lo irradiamos.

- UVA
- Intensidad: 20 J/cm<sup>2</sup>
- Tiempo de exposición: 5 minutos

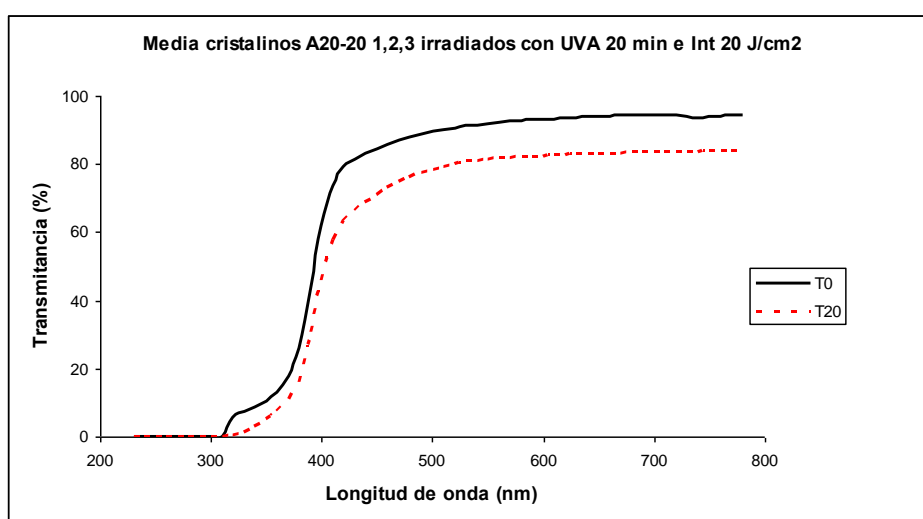
La Figura 53 es la media de las tres curvas de los cristalinos irradiados, que nos muestra cómo se modifica la transmisión espectral del cristalino cuando es irradiado durante 5 minutos con radiación UVA de intensidad 20 J/cm<sup>2</sup>. La diferencia entre las curvas de la Figura 53 no es significativa ya que  $p=0.54$ .



**Figura 53.-** Media de la transmisión espectral de 3 cristalinos. T0 corresponde al cristalino recién extraído; T5 irradiado 5 minutos con UVA y una intensidad de 20 J/cm<sup>2</sup>.

- **UVA**
- **Intensidad: 20 J/cm<sup>2</sup>**
- **Tiempo de exposición: 20 minutos**

La Figura 54 es la media de los tres cristalinios irradiados que nos muestra cómo se modifica la transmisión espectral del cristalino cuando es irradiado durante 20 minutos con radiación UVA de intensidad 20 J/cm<sup>2</sup>. La diferencia entre las curvas de la Figura 54 es significativa con  $p=0.07$ .

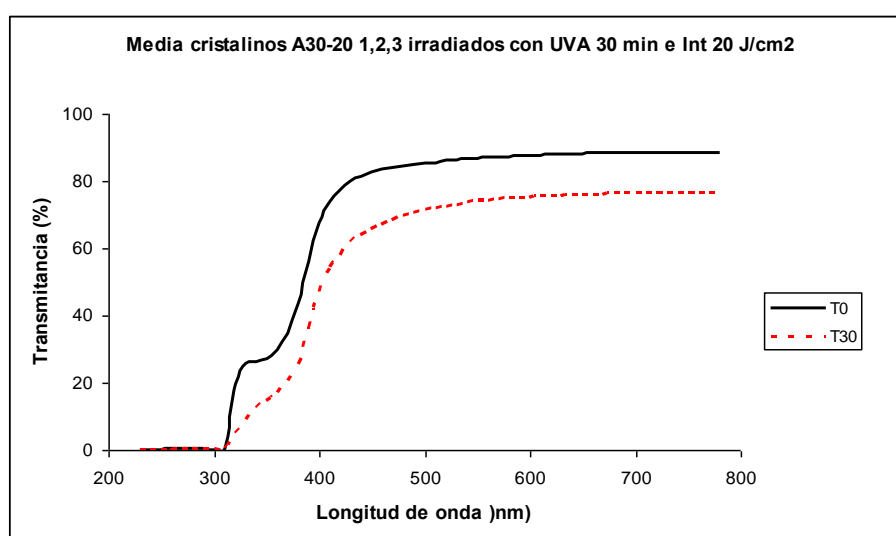


**Figura 54.-** Media de la transmisión espectral de 3 cristalinios. T0 corresponde al cristalino recién extraído; T20 irradiado 20 minutos con UVA y una intensidad de 20 J/cm<sup>2</sup>.



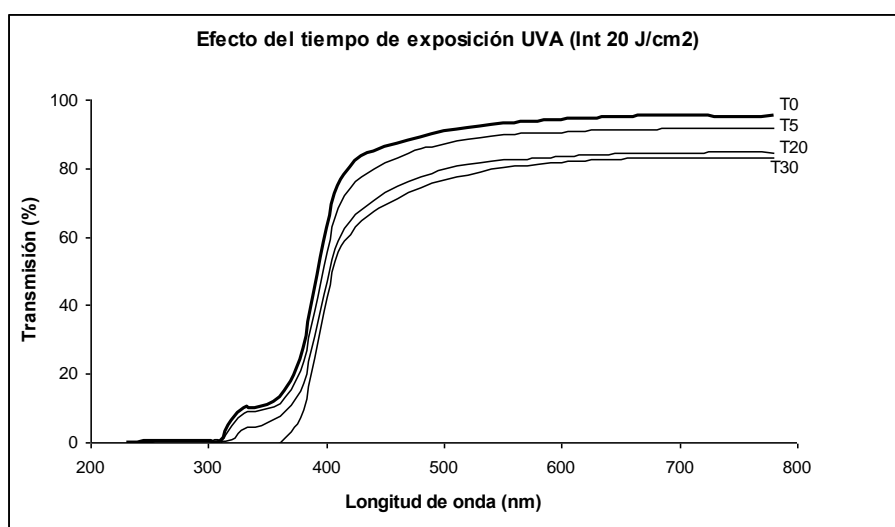
- **UVA**
- **Intensidad: 20 J/cm<sup>2</sup>**
- **Tiempo de exposición: 30 minutos**

La Figura 55 es la media de las tres curvas de los cristalinios irradiados con UVA a 20 J/cm<sup>2</sup> durante 30 minutos. La diferencia entre estas curvas de la Figura 55 es significativa con  $p=0.009$ .



**Figura 55.-** Media de la transmisión espectral de 3 cristalinios. T0 corresponde al cristalino recién extraído; T30 irradiado 30 minutos con UVA y una intensidad de 20 J/cm<sup>2</sup>.

Igual que ocurría con la intensidad de 10 J/cm<sup>2</sup>, estadísticamente no existen diferencias significativas entre el cristalino no irradiado (T0) y el irradiado 5 minutos (T5) para cualquier longitud de onda ( $p=0.54$ ). Por el contrario, sí que existen diferencias significativas, entre el cristalino T0 y los irradiados 20 ( $p=0.07$ ) y 30 ( $p=0.009$ ) minutos, para cualquier longitud de onda, a partir de 380 nm en adelante. Entre T5 y T20 no llega a haber diferencia significativa ( $p=0.13$ ), pero sí la hay entre T5 y T30 ( $p=0.03$ ) desde 350 nm en adelante. Finalmente, no existe diferencia entre T20 y T30 ( $p=0.21$ ).



**Figura 56.-** Variación de la transmisión espectral del cristalino del cerdo irradiado con radiación UVA (315-400 nm) y con una intensidad de  $20 \text{ J/cm}^2$ , para diferentes tiempos de exposición: T0 (sin irradiar); T5 (5 minutos); T20 (20 minutos); T30 (30 minutos).

En esta gráfica (Figura 56) se aprecia, tanto en la región del espectro visible como en el ultravioleta, el mismo comportamiento que en el caso anterior. Es decir, en la región del visible la transmisión disminuye con el tiempo de exposición de manera prácticamente uniforme, aunque en este caso las curvas correspondientes a 20 y 30 minutos de exposición son más similares, a diferencia del caso anterior en que lo eran las curvas correspondientes a 5 y 20 minutos de exposición. La Tabla 5 pone de manifiesto este hecho ya que básicamente se observa para los tiempos de exposición de 20 y 30 minutos un comportamiento similar en la región del visible, produciéndose un descenso de alrededor de un 11% (T20) y de un 13% (T30). En el caso de 5 minutos de exposición, este descenso es menor situándose alrededor del 4%, no siendo significativa esta diferencia. Cuando nos acercamos al límite del espectro visible por la zona de las cortas longitudes de onda, la disminución de la transmisión comienza a ser más acusada sobre todo para exposiciones de 20 y 30 minutos. Para la longitud de onda de 380 nm, que podríamos considerar el límite inferior del espectro visible, esta disminución es ya de un 36% para 20 minutos de exposición y de un 65% para 30 minutos de exposición. Esto significa que, para las cortas longitudes de onda, el cristalino se va opacificando y deja pasar menos luz visible, fundamentalmente la luz azul que es la de longitud de onda más corta.

Longitud de onda (nm)	T5 Disminución Transmisión (%)	T20 Disminución Transmisión (%)	T30 Disminución Transmisión (%)
780	3	11	13
700	4	11	13
600	4	11	13
500	4	12	15
450	5	16	19
420	8	20	24
400	11	25	33
380	14	36	65
350	18	45	100
320	21	82	100

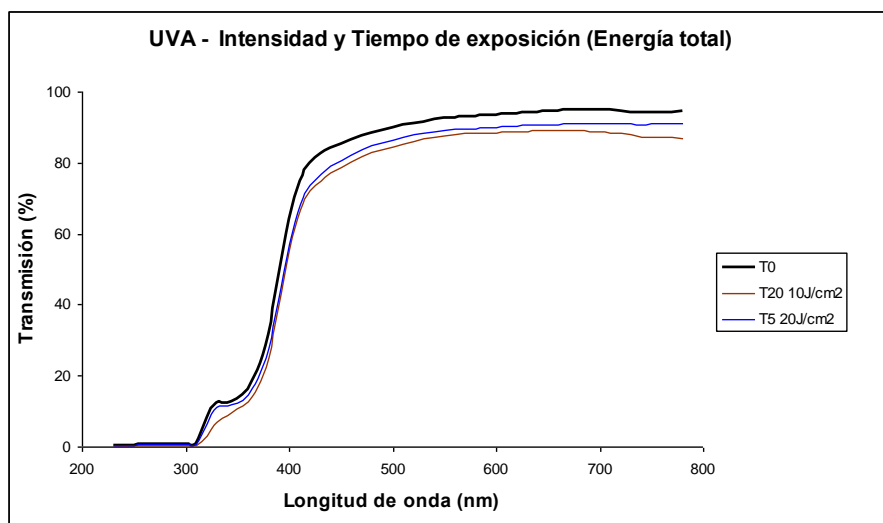
**Tabla 5.-** Disminución de la transmisión del cristalino del cerdo relativa a la de un cristalino recién extraído, después de 5 minutos (T5), 20 minutos (T20) y 30 minutos (T30) de ser irradiados con radiación Ultravioleta A de intensidad  $20 \text{ J/cm}^2$ , para diferentes longitudes de onda.

En la región del UVA la situación es diferente, al igual que ocurría cuando irradiábamos con  $10 \text{ J/cm}^2$ . La transmisión disminuye drásticamente para exposiciones de 20 y 30 minutos, llegando en este último caso a cero (100% de disminución). Para 5 minutos de exposición, aunque disminuye la transmisión lo hace mucho más moderadamente no siendo la diferencia respecto de T0 estadísticamente significativa.

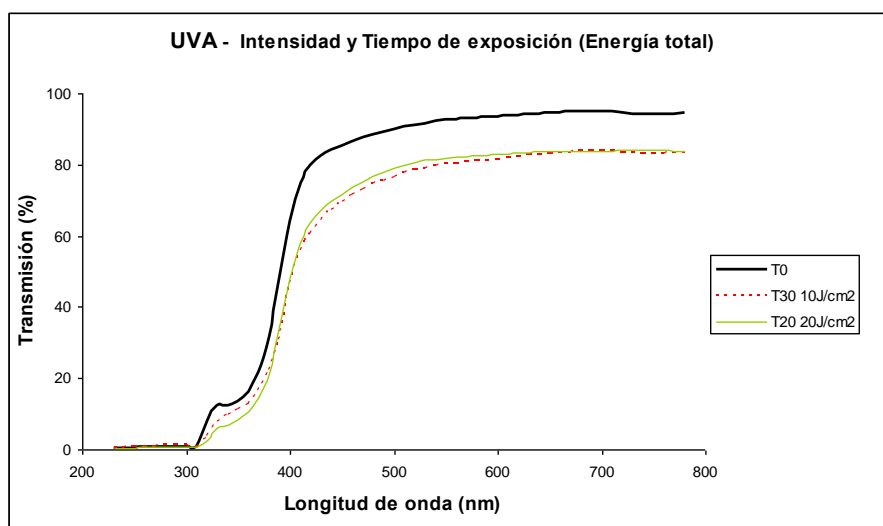
Por tanto, con el aumento de intensidad el resultado es parecido al caso anterior con la diferencia de que la transmisión disminuye más acusadamente. Se observa que 5 minutos, con este tipo de radiación, es poco tiempo para producir efectos apreciables en el cristalino y con 20 y 30 minutos de exposición el efecto en la zona del espectro visible sigue siendo poco apreciable; pero en la región del UVA el efecto es importante haciendo disminuir la transmisión hasta llegar a cero. Es decir la progresiva exposición a la radiación UVA provoca precisamente la disminución de la transmisión en la región del ultravioleta A, hasta llegar a su completa eliminación, es decir transmisión cero. Recordemos que el cristalino del cerdo joven presenta en esta región (320-370 nm) una transmisión de alrededor de un 15%.

Por otro lado, resulta interesante notar que la curva correspondiente a la intensidad de  $10 \text{ J/cm}^2$  y 20 minutos de exposición, es bastante similar a la correspondiente a la de

intensidad  $20 \text{ J/cm}^2$  y 5 minutos de exposición (Figura 57). Igual ocurre cuando la intensidad es de  $10 \text{ J/cm}^2$  y la exposición de 30 minutos que es bastante similar a la correspondiente a  $20 \text{ J/cm}^2$  y 20 minutos de exposición (Figura 58).



**Figura 57.-** Comparación entre intensidad de la radiación por el tiempo de exposición para dos situaciones diferentes:  $10 \text{ J/cm}^2$  durante 20 minutos exposición comparado con  $20 \text{ J/cm}^2$  y 5 minutos de exposición.



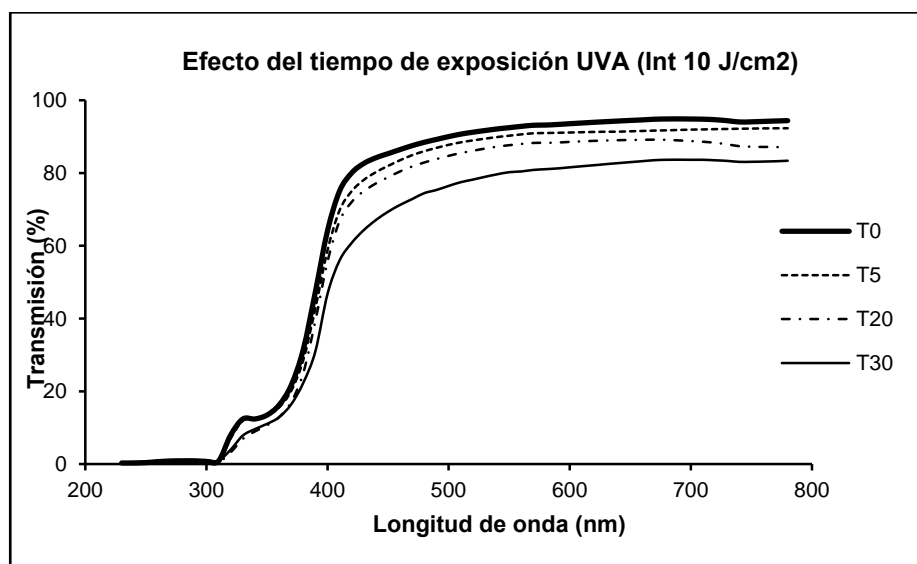
**Figura 58.-** Comparación entre intensidad de la radiación por el tiempo de exposición para dos situaciones diferentes:  $10 \text{ J/cm}^2$  durante 30 minutos exposición comparado con  $20 \text{ J/cm}^2$  y 20 minutos de exposición.

En conclusión, lo que verdaderamente importa del efecto que la radiación UVA pueda tener sobre el cristalino del cerdo, es la cantidad total de energía recibida por el mismo, es decir, el producto de la intensidad por el tiempo de exposición. Este hecho se rige por la ley de reciprocidad de Bunsen-Roscoe, donde el efecto biológico de una exposición a la radiación UV depende del producto de la intensidad de radiación por el tiempo de exposición a la misma (Bunsen and Roscoe, 1862).

#### *Variación de la transmisión con el tiempo de exposición en radiación UVA*

En el estudio, comparamos cómo varía la transmisión espectral del cristalino del cerdo en función del tiempo de exposición. En las siguientes figuras se puede observar para las dos intensidades de radiación, cómo se modifica la transmisión espectral en los diferentes tiempos empleados.

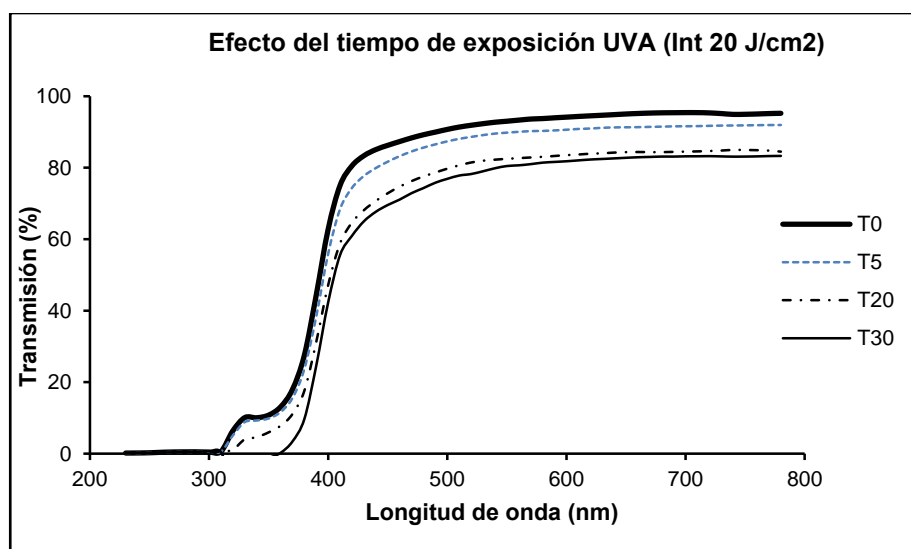
La Figura 59, muestra el efecto del tiempo de exposición en los cristalinios irradiados con radiación UVA durante 5, 20 y 30 minutos e intensidad  $10 \text{ J/cm}^2$ .



**Figura 59.-** Efecto del tiempo de exposición. Comparación entre los cristalinios irradiados con radiación UVA durante 5 (T5), 20 (T20) y 30 (T30) minutos e intensidad  $10 \text{ J/cm}^2$ . T0, cristalino sin irradiar.

El análisis estadístico revela que no existen diferencias significativas entre el cristalino no irradiado (T0) y el irradiado 5 minutos (T5) para cualquier longitud de onda ( $p=0.55$ ). Sin embargo sí que existen diferencias significativas, entre el cristalino T0 y el irradiado 20 minutos (T20) ( $p=0.097$ ) y entre el T0 y el irradiado 30 minutos (T30) (0.024), siendo en ambos casos como vemos  $p<0.1$  para cualquier longitud de onda. Entre T5 y T20 no hay diferencia significativa ( $p=0.24$ ), pero si la hay entre T5 y T30 ( $p=0.07$ ). Finalmente, no existe diferencia entre T20 y T30 ( $p=0.27$ ), aunque por debajo de 420 nm  $p=0.10$  por lo que en esa franja la diferencia sí es significativa según el criterio adoptado.

La Figura 60, muestra el efecto del tiempo de exposición en los cristalinios irradiados con radiación UVA durante 5, 20 y 30 minutos e intensidad  $20 \text{ J/cm}^2$ .



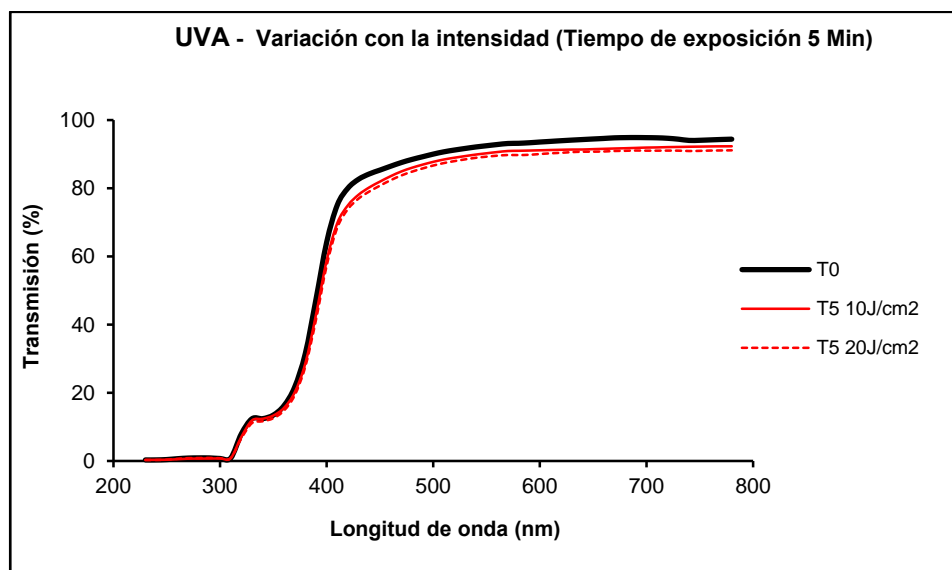
**Figura 60.-** Efecto del tiempo de exposición. Comparación entre los cristalinios irradiados con radiación UVA durante 5 (T5), 20 (T20) y 30 (T30) minutos e intensidad  $20 \text{ J/cm}^2$ . T0, cristalino sin irradiar. Además de la disminución general de la transmitancia con el tiempo de exposición, se puede notar la disminución de la banda de ultravioleta característica de la curva de transmisión del cristalino del cerdo.

El análisis estadístico determina que no existen diferencias significativas entre el cristalino no irradiado (T0) y el irradiado 5 minutos (T5) para cualquier longitud de onda ( $p=0.54$ ). Sin embargo sí que existen diferencias significativas, entre el cristalino T0 y el irradiado 20 minutos (T20) ( $p=0.07$ ), para cualquier longitud de onda y entre el T0 y el irradiado 30 minutos (T30) ( $p=0.009$ ), a partir de 380 nm en adelante. Entre T5 y T20 no

llega a haber diferencia significativa ( $p=0.13$ ), pero si la hay entre T5 y T30 ( $p=0.03$ ) desde 350 nm en adelante. Finalmente, no existe diferencia entre T20 y T30 ( $p=0.21$ ).

#### *Variación de la transmisión según la intensidad*

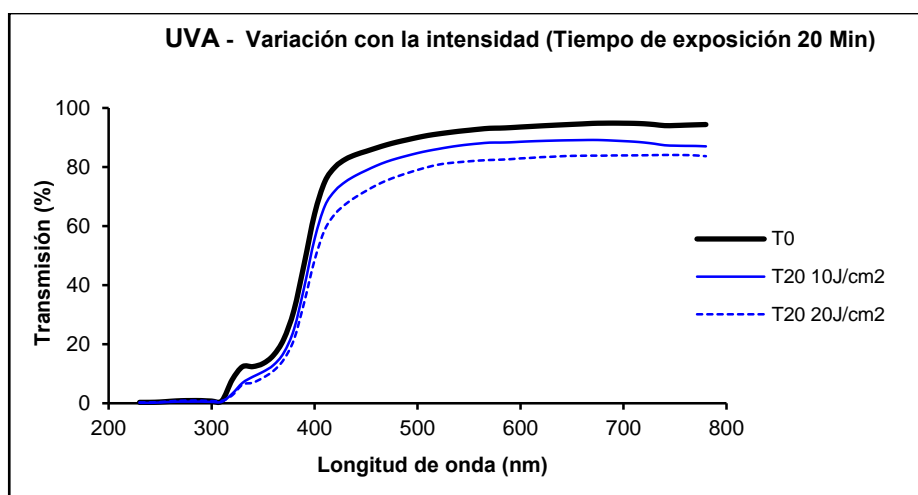
En la Figura 61 se muestra para las dos intensidades utilizadas (10 y 20  $J/cm^2$ ) cómo varía la transmisión espectral del cristalino del cerdo cuando se irradia con radiación UVA durante 5 minutos.



**Figura 61.-** Variación de la transmisión espectral del cristalino de cerdo para las dos intensidades (10 y 20  $J/cm^2$ ) de radiación UVA utilizadas y un tiempo de exposición de 5 minutos.

La diferencia entre las curvas correspondientes a T5 con 10  $J/cm^2$  y 20  $J/cm^2$  de la Figura 61 no es significativa ya que  $p=0.69$ .

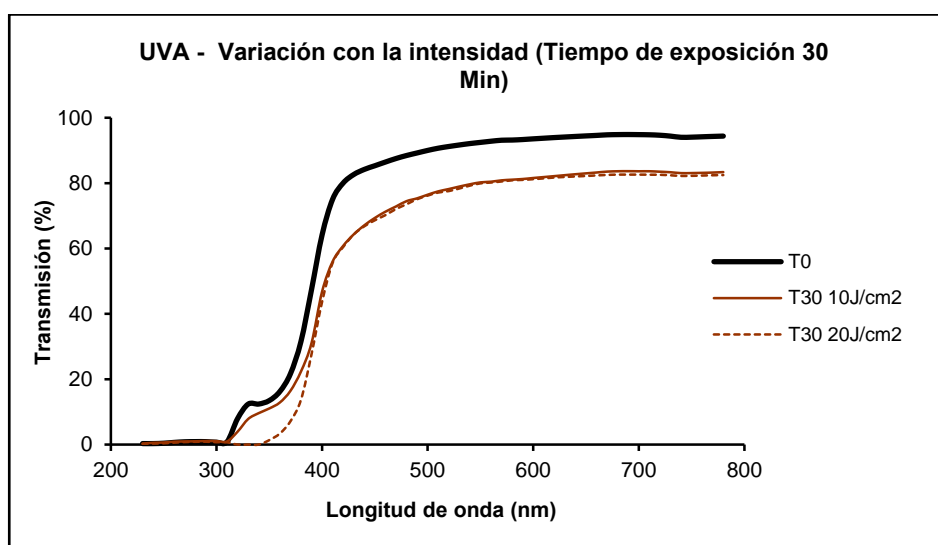
En la Figura 62 se indica para las dos intensidades utilizadas (10 y 20  $J/cm^2$ ) cómo varía la transmisión espectral del cristalino del cerdo cuando se irradia con radiación UVA durante 20 minutos.



**Figura 62.-** Variación de la transmisión espectral del cristalino de cerdo para las dos intensidades (10 y 20 J/cm<sup>2</sup>) de radiación UVA utilizadas y un tiempo de exposición de 20 minutos.

La diferencia entre las curvas correspondientes a T20 con 10 J/cm<sup>2</sup> y 20 J/cm<sup>2</sup> de la Figura 62 no es significativa ya que  $p=0.42$ , excepto en el intervalo 230-300 nm donde  $p=0.051$ .

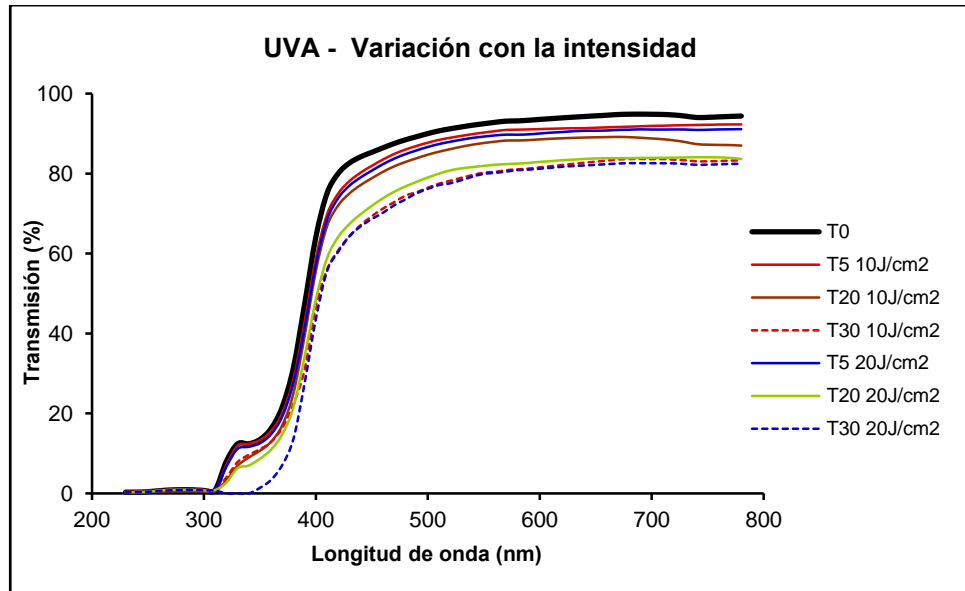
En la Figura 63 se refleja para las dos intensidades utilizadas (10 y 20 J/cm<sup>2</sup>), cómo varía la transmisión espectral del cristalino del cerdo cuando se irradia con radiación UVA durante 30 minutos.



**Figura 63.-** Variación de la transmisión espectral del cristalino de cerdo para las dos intensidades (10 y 20 J/cm<sup>2</sup>) de radiación UVA utilizadas y un tiempo de exposición de 30 minutos.



La diferencia entre las curvas correspondientes a T30 con  $10 \text{ J/cm}^2$  y  $20 \text{ J/cm}^2$  de la Figura 63 no es significativa ya que  $p=0.303$ , aunque igual que en el caso anterior en el intervalo 230-300 nm si que es significativa con  $p=0.048$ .



**Figura 64.-** Variación de la transmisión espectral del cristalino de cerdo para las dos intensidades ( $10$  y  $20 \text{ J/cm}^2$ ) de radiación UVA utilizadas y tiempos de exposición de 5, 20 y 30 minutos.

Como conclusión, en la figura 64 podemos observar que si comparamos las curvas de cada uno de los tiempos de exposición y para los dos intensidades, es decir para T5 comparamos las curvas de intensidades  $10$  y  $20 \text{ J/cm}^2$ , e igual para T20 y T30, vemos que en todos los casos ambas curvas son muy similares y con diferencias no significativas ( $p=0.69$  para T5,  $p=0.42$  para T20 y  $p=0.30$  para T30). Esto nos dice que el efecto de la radiación UVA sobre la transmisión espectral del cristalino del cerdo, es fundamentalmente debido al tiempo de exposición, ya que utilizar una intensidad u otra no hace variar de forma significativa la curva de transmisión, aunque hay que tener en cuenta lo apuntado anteriormente referente a la ley de reciprocidad de Bunsen-Roscoe (Bunsen and Roscoe, 1862).

## Comparación de nuestros datos con los descritos en la literatura

En nuestro conocimiento, los resultados que hemos obtenido no son comparables a los realizados por otros autores. Kessel *et al* (Kessel et al., 2011), aplican intensidades de radiación UVA de  $65 \text{ mW/cm}^2$  (equivalente a  $0,065 \text{ J/cm}^2$ ) a lentes humanas explantadas produciendo opacidades; sin embargo, estas lesiones no se producen cuando se reduce considerablemente la potencia a  $16 \text{ mW/cm}^2$  ( $0,016 \text{ J/cm}^2$ ) aunque si esta intensidad se prolongaba 72 horas, sí se observaba lesiones marrones en la lente. Hay que hacer notar que el julio es unidad de energía, y que 1 vatio (W), que es unidad de potencia, equivale a un Julio por segundo. La intensidad es energía por unidad de superficie, es decir,  $\text{J/cm}^2$  o algunos autores utilizan  $\text{mW/cm}^2$  o  $\text{KJ/m}^2$ , tal y como veremos a lo largo de la discusión.

Otros autores utilizaron intensidades tan bajas de UVA ( $1 \text{ J/cm}^2$ ) que no observan cambios en la lente incluso durante 5 días de exposición en conejos *in vivo*. (Čejka et al., 2009) En nuestros resultados, con una intensidad 10 veces mayor e irradiando durante 5 min, no se vieron cambios significativos en la lente. Giblin y sus colaboradores (Giblin et al., 2002) utilizan una intensidad de radiación muy baja ( $0,5 \text{ mW/cm}^2$ , equivalente a  $0,0005 \text{ J/cm}^2$ ) durante un tiempo muy largo (meses) en cobayas, observando cambios metabólicos en el núcleo de la lente.

Oriowo *et al* (Oriowo et al., 2002) exponen lentes de cerdo cultivadas a una intensidad de UVA de  $43 \text{ J/cm}^2$ , no se producían cambios significativos en la lente, en nuestro estudio con la mitad de dosis se necesita un tiempo de exposición prolongado (20 min) para producir cambios. Sin embargo, cuando estos autores doblaron la dosis a  $86 \text{ J/cm}^2$ , sí vieron cambios metabólicos y de integridad óptica 48 horas tras la exposición. Cuando combinaron una dosis UVA de  $15,63 \text{ J/cm}^2$  y una dosis de UVB de  $0,019 \text{ J/cm}^2$  produjeron cambios adversos significativos en la lente, de manera irreversible. Tal y como veremos más adelante, cuando en nuestro experimento añadimos UVB, también se necesita menos intensidad y tiempo para producir daños en la lente.

En otro trabajo de este mismo equipo, se calculó la  $\text{DE}_{50}$  (Dosis efectiva 50) para la radiación, es decir, la dosis de UV necesaria para producir lesiones en el 50% de las lentes. Los resultados pueden verse en la siguiente figura (Oriowo et al., 2001).

Longitud de onda (nm)	ED <sub>50</sub> Radiación (J/cm <sup>2</sup> )
270	0.05718
275	0.04215
280	0.02776
285	0.02193
290	0.02720
295	0.02949
300	0.06952
305	0.09576
310	0.23400
315	0.74254
320	3.13211
325	18.70360
330	28.01060
340	48.26620
350	111.26900
360	164.03000
365	137.19300
370	N/A (554.92*)

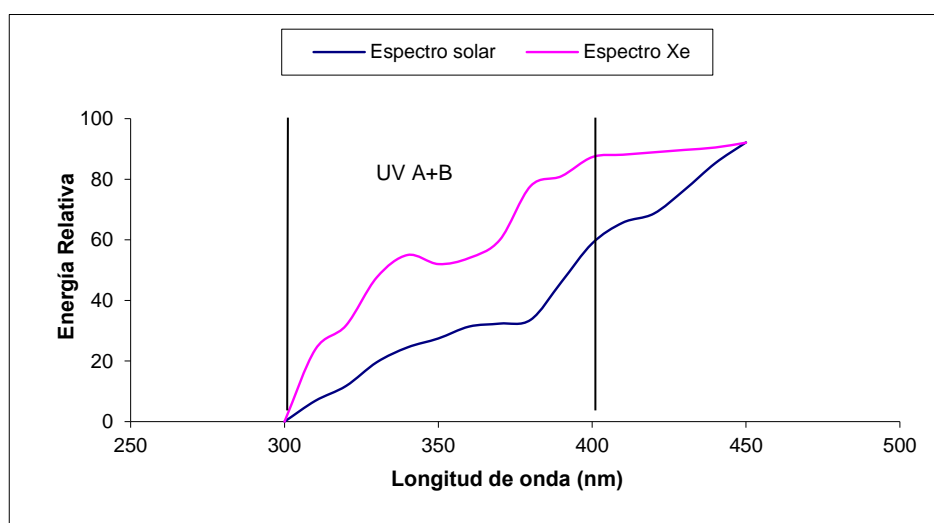
**Tabla 6.** ED<sub>50</sub>: Dosis efectiva de radiación a diferentes longitudes de onda que produce 50% probabilidad de daño (Oriowo et al, 2001).

Se observa como para la radiación UVB se necesita muy poca energía para producir daño, y esta dosis aumenta conforme aumenta la longitud de onda, existiendo un salto a partir de 315 nm, de manera que aumenta considerablemente al pasar a la banda de UVA hasta llegar a una dosis muy alta en las longitudes de onda próximas al espectro visible (Oriowo et al., 2001).

### 5.4.2. RADIACIÓN UV (A+B)

Como hemos apuntado anteriormente, la radiación ultravioleta que llega a la superficie de la tierra procedente del sol comienza a partir de los 300 nm aproximadamente, aunque en esa zona la emisión es muy poco intensa. Sin embargo, la radiación ultravioleta B (UVB) abarca la región comprendida entre 280 y 315 nm luego, aunque con una muy baja intensidad, una porción de UVB (300-315 nm) llega a la superficie de la tierra. Como sabemos la división que se hace del espectro electromagnético en la zona del ultravioleta (UVA, UVB y UVC) responde a los diferentes efectos que dicha radiación tiene en los seres vivos. Conforme la longitud de onda va disminuyendo, sus efectos son mucho más nocivos, luego el UVB es bastante más peligroso que el UVA. En esta experiencia hemos elegido irradiar el cristalino del cerdo, no sólo con el UVA sino añadiéndole la parte de UVB (300-315 nm) presente en la radiación solar.

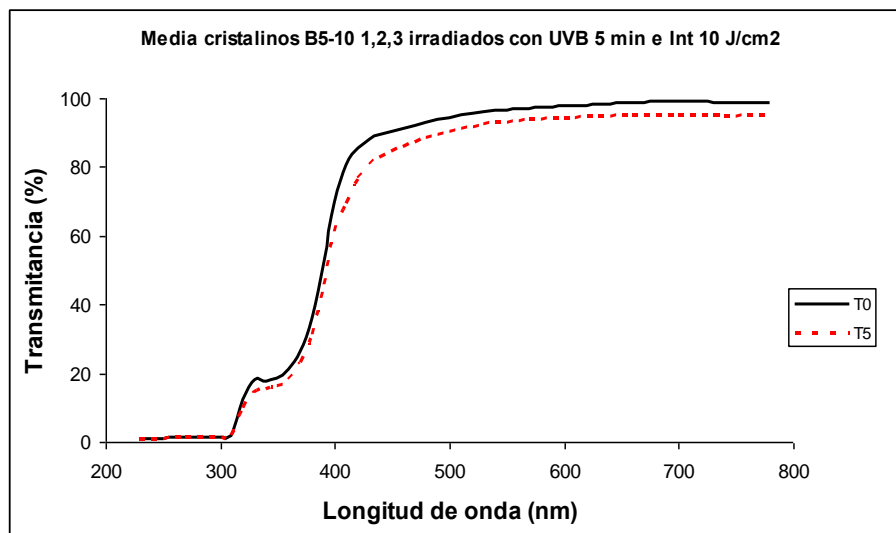
El espectro ultravioleta de la lámpara de Xe utilizada como fuente ultravioleta, es bastante parecida al espectro solar (Figura 65), presentando en ambos casos un aumento de la transmisión conforme aumenta la longitud de onda, aunque este aumento presenta una pendiente algo más acusada en el espectro de la lámpara de Xe que en el espectro solar.



**Figura 65.-** Comparación de la distribución de la energía relativa en al zona de 300 a 400 nm (UV A+B), de los espectros solar y de lámpara de Xe.

- UVB
- Intensidad:  $10 \text{ J/cm}^2$
- Tiempo de exposición: 5 minutos

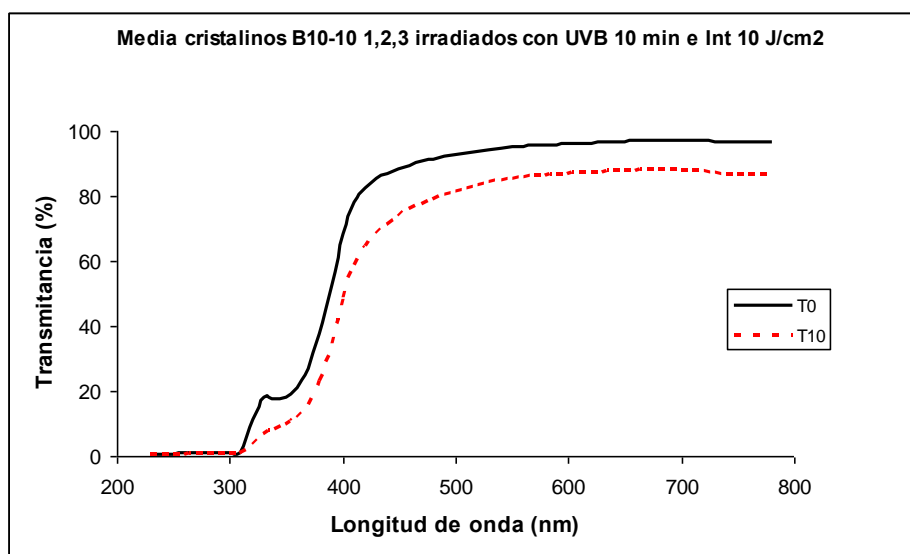
La Figura 66 es la media de las tres curvas de cristalinos irradiados, que nos enseña como se modifica la transmisión espectral del cristalino cuando es irradiado durante 5 minutos con radiación UVB de intensidad  $10 \text{ J/cm}^2$ . La diferencia entre la transmisión de del cristalino no irradiado y el irradiado 5 minutos no es significativa ya que  $p=0.28$ .



**Figura 66.-** Media de la transmisión espectral de 3 cristalinos. T0 corresponde al cristalino recién extraído; T5 irradiado 5 minutos con UVB y una intensidad de  $10 \text{ J/cm}^2$ .

- **UVB**
- **Intensidad: 10 J/cm<sup>2</sup>**
- **Tiempo de exposición: 10 minutos**

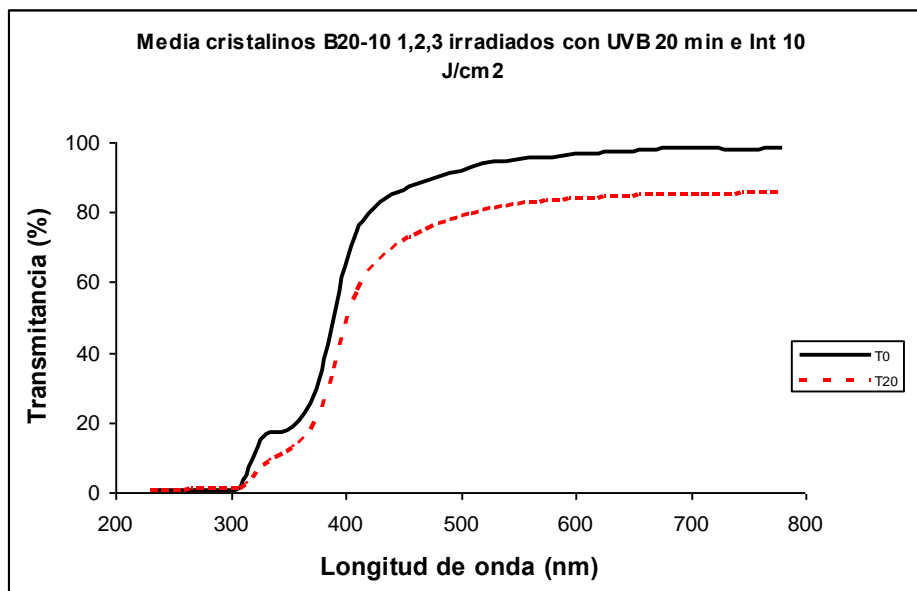
La Figura 67 es la media de las curvas de los tres cristalinicos irradiados. La diferencia entre estas curvas de la Figura 67, sí que es significativa ya que  $p < 0.001$ .



**Figura 67.-** Media de la transmisión espectral de 3 cristalinicos. T0 corresponde al cristalino recién extraído; T10 irradiado 10 minutos con UVB y una intensidad de 10 J/cm<sup>2</sup>.

- **UVB**
- **Intensidad: 10 J/cm<sup>2</sup>**
- **Tiempo de exposición: 20 minutos**

La Figura 68 es la media de las tres curvas de los cristalinos irradiados, que muestra como se modifica la transmisión espectral del cristalino cuando es irradiado durante 20 minutos con radiación UVB de intensidad 10 J/cm<sup>2</sup>. La diferencia entre las curvas de la Figura 68 es significativa a partir de 320 nm, con  $p=0.07$ .

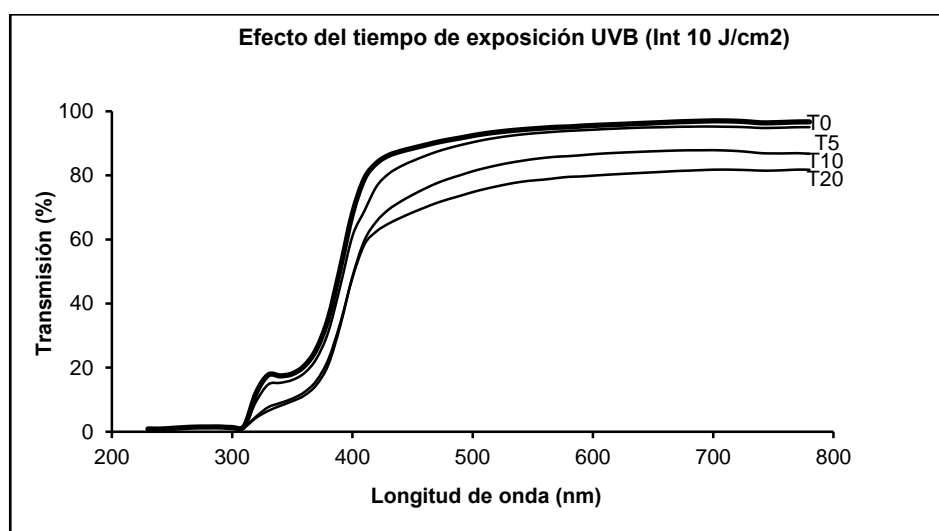


**Figura 68.-** Media de la transmisión espectral de 3 cristalinos. T0 corresponde al cristalino recién extraído; T20 irradiado 20 minutos con UVB y una intensidad de 10 J/cm<sup>2</sup>.

De la misma forma que ocurría con la radiación UVA, estadísticamente no existen diferencias significativas ( $p=0.28$ ) entre el cristalino no irradiado (T0) y el irradiado 5 minutos (T5) con UV(A+B), para cualquier longitud de onda. Sin embargo, sí que existen diferencias significativas entre el cristalino T0 y el irradiado 10 minutos (T10) ( $p<0.001$ ) y entre el T0 y el irradiado 20 minutos (T20) ( $p=0.07$ ). Entre T5 y T10 hasta 400 nm la diferencia no es significativa, pero sí lo es a partir de 400 nm en adelante con  $p=0.05$ . Entre T5 y T20 sigue siendo la diferencia significativa pero en este caso con un  $p=0.1$ . Finalmente, entre T10 y T20 la diferencia no es significativa, aunque la  $p=0.12$ , es decir muy próxima según el criterio adoptado a la significación.

Longitud de onda (nm)	T5 Disminución Transmisión (%)	T10 Disminución Transmisión (%)	T20 Disminución Transmisión (%)
780	3	9	15
700	3	9	15
600	3	9	16
500	3	12	19
450	5	16	23
420	9	22	25
400	11	29	30
380	12	41	37
350	11	48	43
320	12	64	61

**Tabla 7.-** Disminución de la transmisión del cristalino del cerdo relativa a la de un cristalino recién extraído, después de 5 minutos (T5), 10 minutos (T10) y 20 minutos (T20) de ser irradiados con radiación Ultravioleta A+B de intensidad 10 J/cm<sup>2</sup>, para diferentes longitudes de onda.



**Figura 69.-** Efecto del tiempo de exposición. Comparación entre los cristalinos irradiados con radiación UV(A+B) durante 5 (T5), 10 (T10) y 20 (T20) minutos e intensidad 10 J/cm<sup>2</sup>. T0, cristalino sin irradiar.



Como en el caso anterior, analizaremos esta gráfica separando dos zonas: el visible y el ultravioleta.

*a) Espectro visible (380-780 nm)*

En la región del visible (380-780 nm) la transmisión disminuye con el tiempo de exposición de manera prácticamente uniforme. Como se muestra en la Tabla 7, entre 500 y 780 nm la caída media, después de 5 minutos de exposición, es prácticamente uniforme situándose alrededor de un 3%, no siendo esta diferencia, como hemos dicho, estadísticamente significativa ( $p=0.28$ ).

Después de 10 minutos de exposición la caída, en el mismo intervalo, se sitúa en un 9%, también de forma uniforme aunque en 500 nm comienza a aumentar la caída. Después de 20 minutos en un 16% siendo en ambos casos la diferencia con T0 estadísticamente significativa ( $p<0.1$ ). Para la longitud de onda de 450 nm la caída es ligeramente más pronunciada para los tres tiempos de exposición. A partir de los 420 nm la disminución de la transmisión se acentúa ligera pero no significativamente conforme disminuye la longitud de onda para T5, disminuyendo fuertemente para los tiempos de exposición de 10 y 20 minutos, alrededor del 40% en ambos casos en el límite del espectro visible (380nm).

*b) Espectro ultravioleta A+B (300-400 nm)*

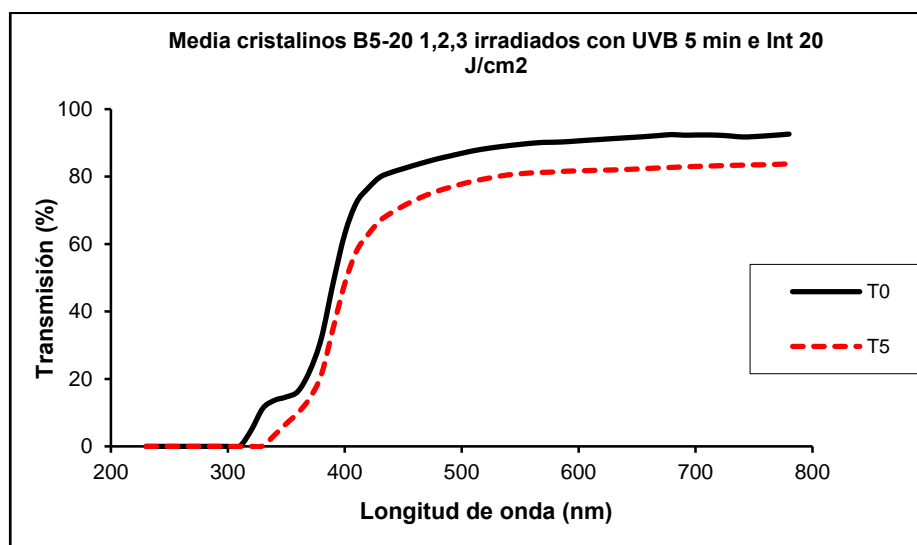
En la región del ultravioleta A+B, la caída en la transmisión del cristalino (Figura 69) es mucho más acusada que en el espectro visible excepto para el caso de 5 minutos de irradiación, donde esa disminución continúa siendo pequeña y no significativa. Por el contrario, para tiempos de exposición de 10 y 20 minutos este descenso, claramente significativo, es de alrededor de un 45% para la longitud de onda de 350 nm y ambas exposiciones, y de alrededor de un 60% para 320 nm y también ambas exposiciones. Para longitudes de onda más bajas la transmisión es prácticamente cero, por lo que podemos volver a considerar 320 nm como la longitud de onda de corte.

De todo lo anterior deducimos que la acción de la radiación ultravioleta A+B de intensidad  $10 \text{ J/cm}^2$  sobre la transmisión espectral del cristalino del cerdo, provoca una disminución de su transmisión que se acentúa con el tiempo de exposición. Sin embargo,

para 5 minutos de exposición esta disminución es muy leve en todo el espectro estudiado, y no estadísticamente significativa. Para exposiciones de 10 y 20 minutos, sí se produce una disminución más acusada y significativa, pero que no es igual en todo el espectro. En el espectro visible esta disminución es más o menos uniforme, mayor por supuesto para 20 minutos de exposición, pero en la región del ultravioleta la disminución de la transmisión aumenta visiblemente y se acelera conforme nos desplazamos hacia las cortas longitudes de onda. Es decir, la radiación ultravioleta provoca una mayor disminución de la transmisión en las cortas longitudes de onda (los azules), pero sobre todo en el ultravioleta, de forma que la meseta de transmisión que el cristalino del cerdo presenta en la región del ultravioleta va desapareciendo conforme lo irradiamos con radiación UV precisamente. Es decir, irradiar el cristalino de cerdo con ultravioleta A+B y una intensidad de radiación de  $10 \text{ J/cm}^2$ , produce unos efectos similares a los obtenidos con radiación UVA, pero con menos tiempo de exposición, ya que antes además de exposiciones de 5 minutos irradiábamos 20 y 30 minutos, mientras que con UV(A+B) los tiempos de exposición empleados han sido de 10 y 20 minutos.

- UVB
- Intensidad: 20 J/cm<sup>2</sup>
- Tiempo de exposición: 5 minutos

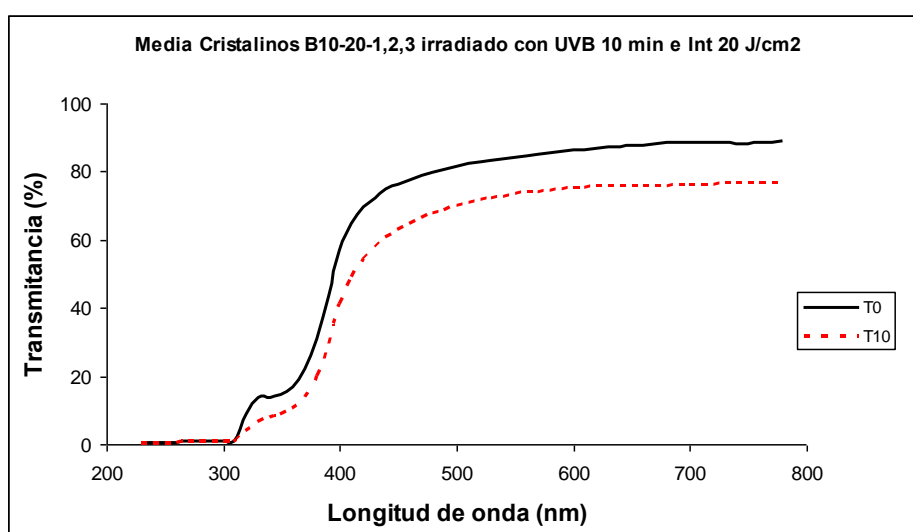
La Figura 70 es la media de los tres cristalinios irradiados, donde se observa cómo se modifica la transmisión espectral cuando se irradia durante 5 minutos con radiación UVB de intensidad 20 J/cm<sup>2</sup>. En este caso, la diferencia entre un cristalino no irradiado e irradiado 5 minutos con UVB e intensidad 20 J/cm<sup>2</sup> es significativa ya que  $p=0.096$ .



**Figura 70.-** Media de la transmisión espectral de 3 cristalinios. T0 corresponde al cristalino recién extraído; T5 irradiado 5 minutos con UVB y una intensidad de 20 J/cm<sup>2</sup>.

- **UVB**
- **Intensidad: 20 J/cm<sup>2</sup>**
- **Tiempo de exposición: 10 minutos**

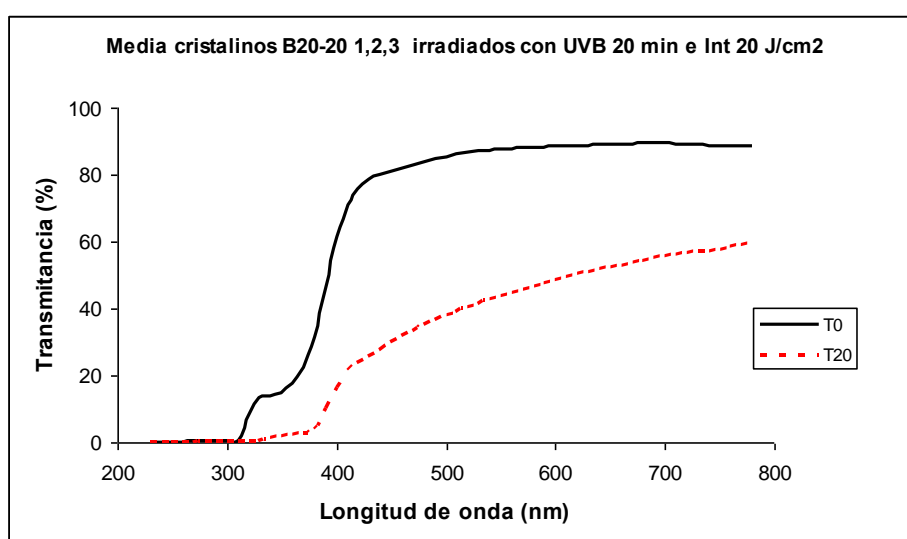
La Figura 71 es la media de las tres curvas de los cristalinos y refleja cómo se modifica la transmisión espectral del cristalino cuando es irradiado durante 10 minutos con radiación UVB de intensidad 20 J/cm<sup>2</sup>. La diferencia entre las curvas es significativa a partir de la longitud de onda de 320 nm en adelante, con  $p=0.027$ .



**Figura 71.-** Media de la transmisión espectral de 3 cristalinos. T0 corresponde al cristalino recién extraído; T10 irradiado 10 minutos con UVB y una intensidad de 20 J/cm<sup>2</sup>.

- **UVB**
- **Intensidad: 20 J/cm<sup>2</sup>**
- **Tiempo de exposición: 20 minutos**

La Figura 72 es la media de los cristalinos irradiados que nos muestra como se modifica la transmisión espectral del cristalino cuando es irradiado durante 20 minutos con radiación UVB de intensidad 20 J/cm<sup>2</sup>. La diferencia entre las curvas, tal y como se ve en la figura, es fuertemente significativa con  $p=0.005$  desde 320 nm en adelante.

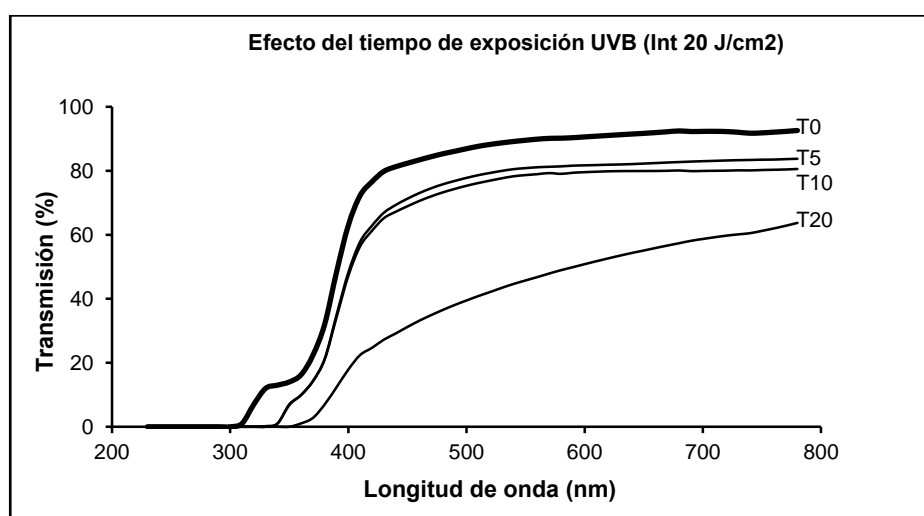


**Figura 72.-** Media de la transmisión espectral de 3 cristalinos. T0 corresponde al cristalino recién extraído; T20 irradiado 20 minutos con UVB y una intensidad de 20 J/cm<sup>2</sup>.

El análisis estadístico nos dice que la diferencia entre el cristalino no irradiado (T0) y los irradiados con UV(A+B) durante 5, 10 y 20 minutos, es significativa en todos los casos. Concretamente el irradiado 20 minutos (T20) presenta una diferencia con T0 muy significativa ( $p=0.005$ ) a partir de la longitud de onda de 320 nm en adelante, y las diferencias con T0 de los cristalinos irradiados 5 minutos (T5) ( $p=0.096$ ) y 10 minutos (T10) (0.027), siguen siendo significativas para cualquier longitud de onda a partir de 320 nm. Entre la curva T5 y T10, la diferencia no es significativa ya que  $p=0.22$ , pero entre T5 y T20 la diferencia si que es significativa a partir de 350 nm en adelante con  $p=0.007$ . También se observa que la diferencia entre T10 y T20 es significativa con  $p=0.033$ .

Longitud de onda (nm)	T5 Disminución Transmisión (%)	T10 Disminución Transmisión (%)	T20 Disminución Transmisión (%)
780	10	13	31
700	10	13	36
600	10	13	44
500	11	13	55
450	13	16	62
420	13	20	68
400	22	25	71
380	33	34	78
350	51	50	100
320	100	100	100

**Tabla 8.-** Disminución de la transmisión del cristalino del cerdo relativa a la de un cristalino recién extraído, después de 5 minutos (T5), 10 minutos (T10) y 20 minutos (T20) de ser irradiados con radiación Ultravioleta A+B de intensidad  $20 \text{ J/cm}^2$ , para diferentes longitudes de onda.



**Figura 73.-** Efecto del tiempo de exposición. Comparación entre los cristalinos irradiados con radiación UV(A+B) durante 5 (T5), 10 (T10) y 20 (T20) minutos e intensidad  $20 \text{ J/cm}^2$ . T0, cristalino sin irradiar.

En la Figura 73 se aprecia, tanto en la región del espectro visible como en el ultravioleta, el mismo comportamiento que en el caso anterior. Es decir, en la región del visible la transmisión disminuye con el tiempo de exposición de manera prácticamente uniforme, aunque en este caso las curvas correspondientes a 5 y 10 minutos de exposición

presentan una disminución muy similar, a diferencia del caso anterior en que la disminución en la transmisión era más escalonada entre las tres exposiciones. La Tabla 8 pone de manifiesto este hecho ya que básicamente se observa para los tiempos de exposición de 5 y 10 minutos un comportamiento similar en la región del visible, produciéndose un descenso de alrededor de un 10% (T5) y de un 13% (T10). Cuando nos acercamos al límite del espectro visible por la zona de las cortas longitudes de onda (400 nm), la disminución de la transmisión comienza a ser más acusada con un 22% y 25% para las exposiciones de 5 y 10 minutos, pero de una disminución drástica del 71% para la exposición de 20 minutos. Para la longitud de onda de 380 nm, que podríamos considerar el límite inferior del espectro visible, esta disminución es ya de un 33% para 5 minutos de exposición y de un 34% para 10 minutos de exposición, alcanzándose el 78% para la exposición de 20 minutos. Podemos observar, que a diferencia de lo que ocurría al irradiar con una intensidad de 10 J/cm<sup>2</sup> donde la disminución de transmisión era muy similar entre las exposiciones de 10 y 20 minutos, en el caso de irradiar con 20 J/cm<sup>2</sup> las curvas que resultan similares son las de 5 y 10 minutos de exposición. En general, esto significa que, al igual que ocurría con el UVA pero en este caso de forma más acusada, para las cortas longitudes de onda el cristalino se va opacificando y deja pasar menos luz visible fundamentalmente la luz azul conforme se irradia más con UV(A+B).

En la región del UVA, la transmisión disminuye drásticamente para exposiciones de 5 y 10 minutos, disminuyendo un 51% y un 50% respectivamente y llegando en el caso de 20 minutos de exposición a transmisión cero (es decir, 100% de disminución). Cuando nos acercamos a la región del UVB (320 nm), para los tres tiempos de exposición, la transmisión es cero (100% de disminución).

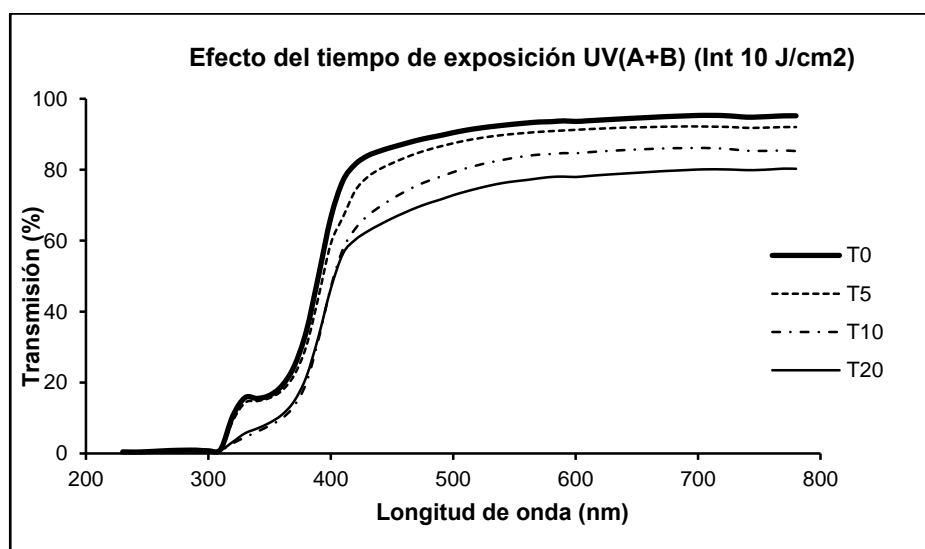
Por tanto, el irradiar UV(A+B) con más intensidad en el cristalino de cerdo produce, como en los casos anteriores, una disminución de la transmisión espectral pero mucho más acusada. Con sólo una exposición de 5 minutos, ya se producen efectos apreciables y significativos en la transmisión del cristalino dentro de la región del visible, acentuándose esta disminución en las cortas longitudes de onda y sobre todo en la región del ultravioleta donde la transmisión llega a anularse. Este comportamiento es casi similar con 10 minutos de exposición, pero cuando aumentamos la exposición hasta 20 minutos la opacificación del cristalino es evidente produciéndose un descenso en la transmisión muy acusado en todo el espectro pero, como siempre ocurre en este estudio, es mayor en las cortas longitudes de onda y el UV lo que implica un ligero amarilleamiento del cristalino. Igual que ocurría con la radiación UVA, una progresiva exposición a la radiación UV(A+B) provoca precisamente la

disminución de la transmisión en la región del ultravioleta A, hasta llegar a transmisión cero, pero en menos tiempo.

En este caso, también puede observarse el cumplimiento de la ley de reciprocidad de Bunsen-Roscoe, ya que prácticamente se obtiene el mismo resultado irradiando un cristalino con UV(A+B) durante 10 minutos con una intensidad de  $10 \text{ J/cm}^2$  que durante 5 minutos pero con una intensidad de  $20 \text{ J/cm}^2$ . Es decir, lo importante es la energía total recibida.

#### Variación con el tiempo

La Figura 74 muestra el efecto del tiempo de exposición en los cristalinos irradiados con radiación UVB durante 5, 20 y 20 minutos e intensidad  $10 \text{ J/cm}^2$ .



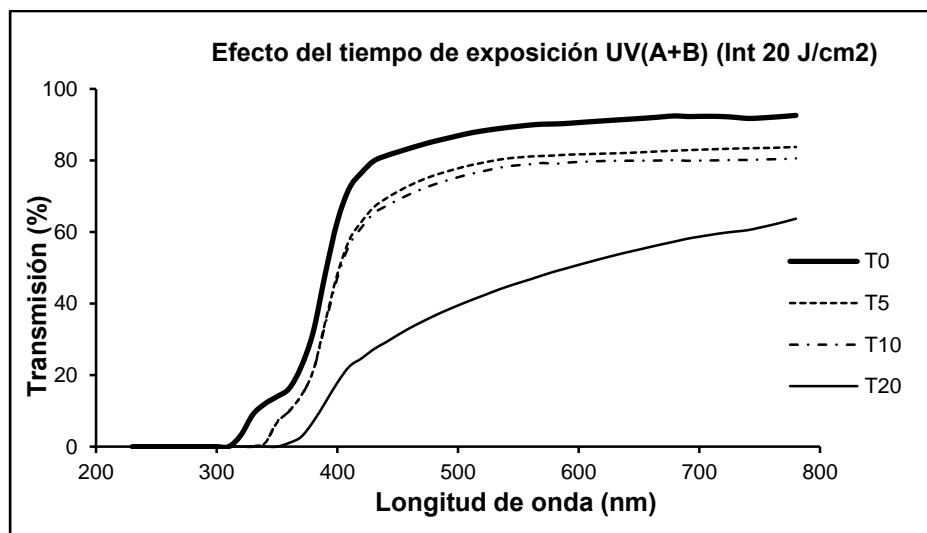
**Figura 74.-** Efecto del tiempo de exposición. Comparación entre los cristalinos irradiados con radiación UV(A+B) durante 5 (T5), 10 (T10) y 20 (T20) minutos e intensidad  $10 \text{ J/cm}^2$ . T0, cristalino sin irradiar.

El análisis estadístico muestra que no existen diferencias significativas entre el cristalino no irradiado (T0) y el irradiado 5 minutos (T5) para cualquier longitud de onda ( $p=0.28$ ). Sin embargo sí que existen diferencias significativas entre el cristalino T0 y el irradiado 10 minutos (T10) ( $p < 0.001$ ) y entre el T0 y el irradiado 20 minutos (T20) ( $p=0.07$ ).



Entre T5 y T10 hasta 400 nm la diferencia no es significativa, pero sí lo es a partir de 400 nm en adelante con  $p=0.05$ . Entre T5 y T20 sigue siendo la diferencia significativa pero en este caso con un  $p=0.1$ . Entre T10 y T20 la diferencia no sale significativa, aunque la  $p=0.12$ , es decir muy próxima según el criterio adoptado a la significación

La Figura 75 refleja el efecto del tiempo de exposición en los cristalinicos irradiados con radiación UVB durante 5, 10 y 20 minutos e intensidad  $20 \text{ J/cm}^2$ .

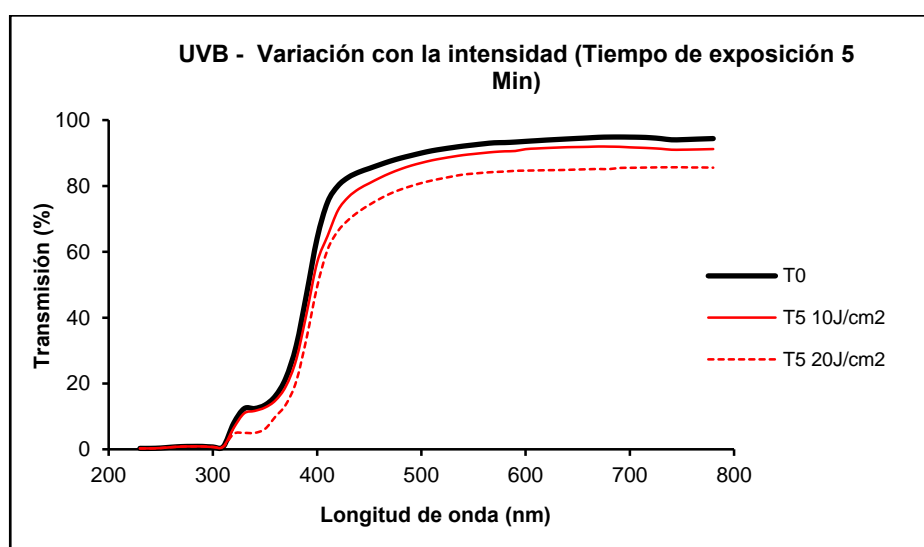


**Figura 75.-** Efecto del tiempo de exposición. Comparación entre los cristalinicos irradiados con radiación UV(A+B) durante 5 (T5), 10 (T10) y 20 (T20) minutos e intensidad  $20 \text{ J/cm}^2$ . T0, cristalino sin irradiar.

En este caso, el análisis estadístico revela que la diferencia entre el cristalino no irradiado (T0) y el irradiado 20 minutos (T20) presenta una diferencia muy significativa ( $p=0.005$ ) a partir de la longitud de onda de 320 nm en adelante. Cuando comparamos T0 y los cristalinicos irradiados 5 minutos (T5) ( $p=0.096$ ) y 10 minutos (T10) ( $0.027$ ), las diferencias entre las curvas siguen siendo significativas para cualquier longitud de onda a partir de 320 nm. Entre la curva T5 y T10, la diferencia no es significativa ya que  $p=0.22$ , pero entre T5 y T20 la diferencia sí que es significativa a partir de 350 nm en adelante con  $p=0.007$ . La diferencia entre T10 y T20 también es significativa con  $p=0.033$ .

*Variación de la transmisión según la intensidad*

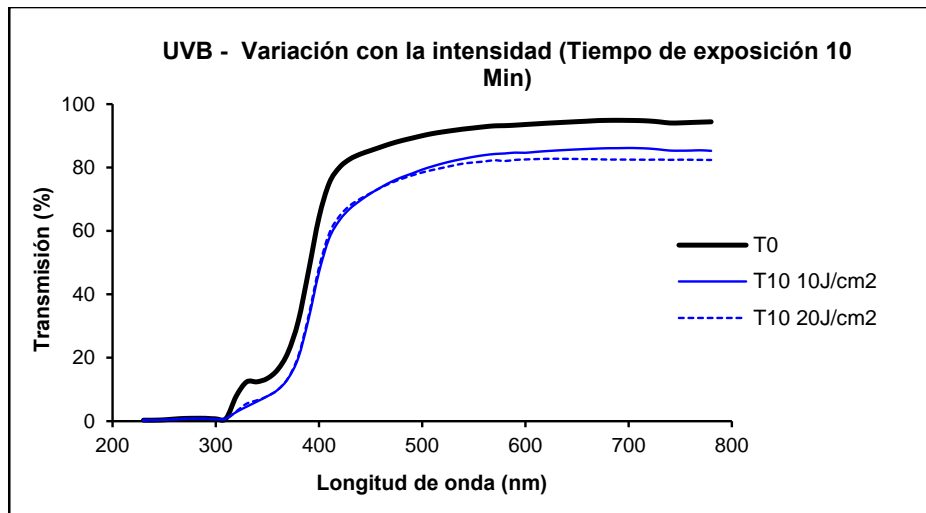
En la Figura 76 se muestra para las dos intensidades utilizadas (10 y 20 J/cm<sup>2</sup>) cómo varía la transmisión espectral del cristalino del cerdo cuando se irradia con radiación UVB durante 5 minutos.



**Figura 76.-** Variación de la transmisión espectral del cristalino de cerdo para las dos intensidades de radiación UVB utilizadas y un tiempo de exposición de 5 minutos.

La diferencia entre las curvas correspondientes a T5 con 10 J/cm<sup>2</sup> y 20 J/cm<sup>2</sup> de la Figura 76 no es significativa ya que  $p=0.16$ , aunque según el criterio adoptado está muy cerca de serlo.

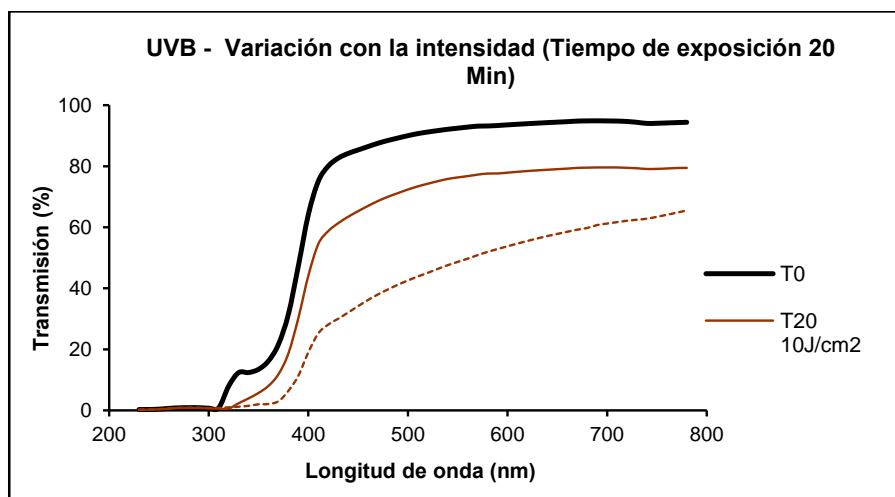
En la Figura 77 se muestra para las dos intensidades utilizadas (10 y 20 J/cm<sup>2</sup>) cómo varía la transmisión espectral del cristalino del cerdo cuando se irradia con radiación UVB durante 10 minutos.



**Figura 77.-** Variación de la transmisión espectral del cristalino de cerdo para las dos intensidades de radiación UVB utilizadas y un tiempo de exposición de 10 minutos.

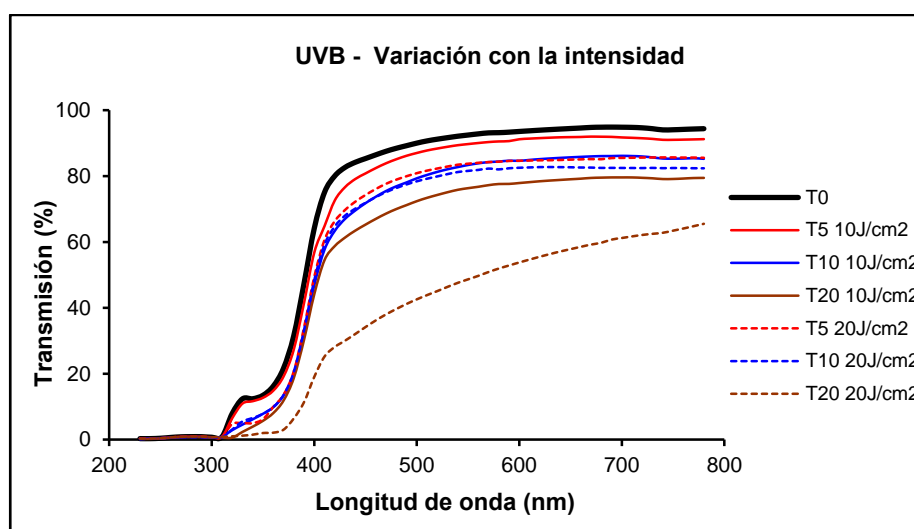
La diferencia entre las curvas correspondientes a T10 con  $10 \text{ J/cm}^2$  y  $20 \text{ J/cm}^2$  de la Figura 77 es significativa ya que  $p=0.036$ .

En la Figura 78 se muestra para las dos intensidades utilizadas ( $10$  y  $20 \text{ J/cm}^2$ ) cómo varía la transmisión espectral del cristalino del cerdo cuando se irradia con radiación UVB durante 20 minutos.



**Figura 78.-** Variación de la transmisión espectral del cristalino de cerdo para las dos intensidades de radiación UVB utilizadas y un tiempo de exposición de 20 minutos.

La diferencia entre las curvas correspondientes a T20 con 10 J/cm<sup>2</sup> y 20 J/cm<sup>2</sup> de la Figura 78 no es significativa ya que  $p=0.57$ .



**Figura 79.-** Variación de la transmisión espectral del cristalino de cerdo para las dos intensidades de radiación UVB utilizadas y todos los tiempos de exposición utilizados.

En dicha figura se representan, como en el caso anterior, las curvas correspondientes a las dos intensidades utilizadas (10 y 20 J/cm<sup>2</sup>) para cada uno de los tiempos de exposición usados (5, 10 y 20 minutos). Si analizamos estas curvas por las parejas correspondientes, es decir, para el tiempo de exposición de 5 minutos las dos intensidades, e igual para los tiempos de 10 y 20 minutos, vemos que para 5 minutos de exposición la diferencia entre las curvas correspondientes a 10 y 20 J/cm<sup>2</sup> de intensidad no es significativa ( $p=0.16$ ); para 10 minutos de exposición tampoco presentan diferencia significativa ( $p=0.30$ ) las curvas correspondientes a las dos intensidades, y sólo presenta una diferencia clara el caso de 20 minutos de exposición ( $p<0.01$ ).

Estos resultados nos dicen que al igual que en el caso de utilizar radiación UVA, lo que más afecta a la transmisión espectral del cristalino en nuestro experimento es el tiempo de exposición, pues salvo en el caso de 20 minutos de exposición donde la intensidad tiene un claro efecto, con tiempos de exposición de 5 y 10 minutos las intensidades utilizadas prácticamente no tiene ningún efecto en la transmisión del cristalino. En cualquier caso hay que tener en cuenta la ley de reciprocidad, pues un cálculo exacto de la energía total teniendo en cuenta la intensidad y el tiempo de exposición, daría resultados similares. En el caso citado de 20 minutos de exposición y 20 J/cm<sup>2</sup> de intensidad la aparición de

opacidades se hace evidente y por consiguiente su fuerte influencia en la transmisión espectral.

### **Comparación de nuestros resultados con la bibliografía actual**

Nuestro estudio revela, que a las intensidades y tiempos utilizados, la radiación UV (A+B) produce una disminución en la transmisión del cristalino, que es uniforme para la región del espectro visible, pero en la región UV esta reducción es más acusada, llegando a una transmisión de cero en 320 nm cuando se utiliza 20 J/cm<sup>2</sup> en cualquiera de los tres tiempos.

En nuestro conocimiento, existen en la bibliografía numerosos estudios tanto *in vivo* como *in vitro* que estudian los efectos de la radiación UVB en el cristalino de diferentes especies. La especie más utilizada es la rata y los estudios se realizaron *in vivo* con los animales anestesiados. (Ayala et al., 2000; Dong et al., 2005, 2003; Galichanin et al., 2010; Michael and Brismar, 2001; Michael, 2000; Michael et al., 1998; Mody Jr. et al., 2006; Soderberg, 1990a, 1990b). En todos estos trabajos el método que se suele utilizar para evaluar el grado de la catarata es cuantificando la luz dispersa (scattering) que se producía al pasar a través de la muestra, comparándola con un estándar. Cuanta más luz dispersa una muestra, menos transparente es, y por tanto su transmisión es menor.

Ayala y sus colaboradores (2000) analizan la validez de la ley de reciprocidad de Bunsen-Roscoe en el desarrollo de cataratas producidas por exposición a la radiación UV en ratas Sprague-Dawley. Para ello, tras anestesiarse a las ratas, las sometieron a una radiación UVB (300 nm), manteniendo la misma intensidad (8 KJ/m<sup>2</sup>, equivalente a 0,8 J/cm<sup>2</sup>) y variando el tiempo de exposición (7.5, 15, 30, 60 y 120 min). Sus resultados muestran que el tiempo de exposición tiene importancia con dosis bajas (5 min), pero a partir de 15 min, donde ocurre el máximo daño en la lente, la respuesta biológica es menor, pareciéndose más a la de 5 min. Por tanto, se puede decir, que con dosis altas se produce una especie de saturación. Es decir, la ley de reciprocidad fotoquímica de Bunsen-Roscoe se cumple pero modulada por la respuesta biológica. Estos resultados son comparables a los hallados en nuestro estudio, ya que también comprobamos que la ley de Bunsen-Roscoe se cumple, pero en nuestro caso, cuando la intensidad es más baja (10 J/cm<sup>2</sup>) la influencia del tiempo de exposición es mayor (Bunsen and Roscoe, 1862).

En diferentes estudios, el equipo de Michael y colaboradores (1998) estudian el efecto de la radiación UVB en los cristalinos de rata. En el primero, irradian los ojos de los animales con UVB de 300 nm a  $5 \text{ KJ/m}^2$  (equivalente a  $0,5 \text{ J/cm}^2$ ) durante 15 min, y evalúan el daño celular mediante la técnica TUNEL, que mide la apoptosis celular. Concluyeron que la radiación producía un pico de apoptosis celular a las 24 horas de la exposición que afectaba a todo el epitelio. En un segundo estudio, se comprobó que el ojo irradiado a diferentes intensidades durante 15 min, producía más dispersión de luz, y por tanto más opacidad, que el ojo contralateral que no se irradiaba (Michael, 2000). Además se observó que cuanto más intensidad, más dispersión existía, tal y como podemos comprobar en nuestros resultados, donde cuanto más radiación más disminución de la transmisión, llegando incluso a no transmitir luz cuando es una exposición aguda en un tiempo largo (20 min). Por último, estudiaron la relación que tiene en la formación de opacidades, la densidad de proteínas y el contenido en agua de la lente, tras haberlas irradiado con UVB a 300 nm y diferentes intensidades (entre  $0,1$  y  $20 \text{ KJ/m}^2$  durante 15 min, equivalente a  $0,01$  y  $1,4 \text{ J/cm}^2$ ). En sus resultados se observa que no hay cambios en la densidad de proteínas entre los ojos irradiados y los que no se irradiaron, sin embargo, el contenido en agua varió con altas dosis de radiación, donde una absorción de agua marcada se correlaciona con la formación de una catarata severa. (Michael and Brismar, 2001) En nuestro caso estos parámetros no se tuvieron en consideración, aunque sí vimos un arrugamiento de la lente tras una exposición severa de UVB ( $20 \text{ J/cm}^2$ ), como veremos más adelante en el apartado de opacidades del cristalino (Figuras 17 y 18) que podría ser consecuente con estos resultados.

En otro estudio de Galichanin y sus colaboradores (2010) se exponen a ratas a una intensidad de  $8 \text{ KJ/m}^2$  (equivalente  $0,8 \text{ J/cm}^2$ ) durante 15 minutos para medir la dispersión de luz en el cristalino. En sus resultados se observa cómo dicha dispersión aumenta exponencialmente tras la exposición a la radiación. Después, compara sus estudios con los resultados de Soderberg (Soderberg, 1990b), donde se irradiaron ratas con UVB a  $30 \text{ KJ/m}^2$  (equivalente  $3 \text{ J/cm}^2$ ) y ven un mismo comportamiento, aunque comprueban que cuanto más dosis de radiación se alcanza una dispersión mayor de la luz y más rápido. Este fenómeno ocurre también en nuestros resultados, donde con una intensidad de  $20 \text{ J/cm}^2$ , la transmisión disminuye en mayor grado y en menos tiempo que para  $10 \text{ J/cm}^2$ .

Un dato importante obtenido en el trabajo de Soderberg (Soderberg, 1990(b)), es la posibilidad de una respuesta sistémica en la formación de cataratas producida por la radiación. Lo concluyeron al observar cómo se alteraba la dispersión de luz del ojo

irradiado, pero también disminuía, en menor medida pero significativamente, la transmisión del ojo contralateral no irradiado. En nuestro caso al tratarse de un estudio *in vitro* no pudimos comprobar este hecho, aunque es un hecho interesante a estudiar.

En otro trabajo se investigó el efecto de la edad en la formación de cataratas inducida por UVB. Para ello, expusieron a ratas a la radiación con una intensidad de 0 a 8 KJ/m<sup>2</sup> en diferentes grupos de edades (de 3 a 18 semanas de edad), y a la semana de la exposición sacrificaron a los animales y midieron la dispersión. Establecieron una DMT para cada grupo de edad, concluyendo que las ratas jóvenes son más susceptibles a la radiación UVB que las mayores (Dong et al., 2003). Este mismo grupo realizó posteriormente el mismo experimento con ratas mayores, viendo que la sensibilidad a la radiación UVB se incrementa conforme aumenta la edad durante el primer tercio de vida de la rata, estabilizándose a un nivel constante el resto de su vida (Dong et al., 2005). Esto supone un dato interesante, puesto que la edad supone un factor importante en la formación de cataratas, que no pudimos comprobar en nuestro caso puesto que la muestra era homogénea.

Mody y sus colaboradores (2006) determinan que la DMT en ratas de 7 semanas de vida, es 3 KJ/m<sup>2</sup> de UVB, lo cual se aproxima a los resultados del estudio anterior de Dong et al (Dong et al., 2003). A partir de esa dosis, se produjeron cataratas corticales. Este dato no se correlaciona con los resultados que hemos hallado en el cristalino de cerdo, donde con 10 J/cm<sup>2</sup> durante 5 min todavía no produce cambios significativos en la transmisión, sin embargo para 20 J/cm<sup>2</sup> durante 5 min sí hay significación, por lo que para dicho tiempo de exposición, la dosis máxima para la especie porcina debería estar entre las dos intensidades. En su siguiente estudio, Mody et al (Mody Jr. et al., 2012) utilizan cobayas, conejos y ratas para determinar las diferencias de formación de cataratas entre especies y determinar la DMT en cobaya. Expusieron a las cobayas a altas dosis de UVB, midieron al dispersión y establecieron la DTM en 69 KJ/m<sup>2</sup> (equivalente 6,9 J/cm<sup>2</sup>), lo cual es mucho mayor que lo que establecieron Pitts et al (Pitts et al., 1977) para el conejo pigmentado (0,2 J/cm<sup>2</sup>). Por último, concluyeron que la cobaya es menos sensible a la radiación UVB que la rata y el conejo pigmentados. En nuestro estudio necesitábamos 10 J/cm<sup>2</sup> para producir opacidades en el cristalino del cerdo, con un tiempo de exposición de 10 minutos, mientras que Pitts et al necesitaron 0,5 J/cm<sup>2</sup> durante 2 s aproximadamente para producir opacidades permanentes en el cristalino del conejo que se vieron a las 24 h de la exposición. Mody et al (Mody Jr. et al., 2012) no especifican el tiempo de exposición. No obstante, hay que hacer notar que nuestro experimento se realizó con los cristalinos *in vitro*, mientras que los casos de conejos y cobayas citados se realizaron *in vivo*, sacrificando

posteriormente a los animales. Finalmente, es interesante observar que Mody *et al* (2012) encuentran que, en el cristalino de la cobaya se produce siempre una catarata subcapsular anterior (CSA), igual que ocurre en nuestro caso cuando irradiamos el cristalino del cerdo con UV(A+B). Así mismo, Oriowo *et al* (2001) comprobaron que la radiación en la banda de 295 nm es 25 veces más eficaz en producir lesiones subcapsulares anteriores, que en 315 nm.

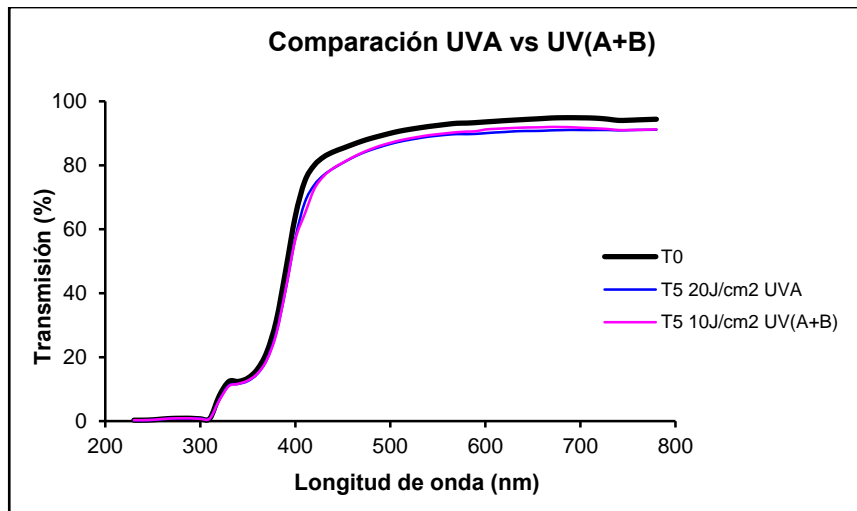
En cerdos, el único estudio sobre los efectos de la radiación UVB en la lente es el realizado por Okuno *et al* (Okuno *et al.*, 2012), pero utilizan células epiteliales del cristalino y evalúan la muerte celular producida por la radiación, medida en cambios metabólicos en las células. Esto no nos permite realizar comparaciones con nuestro trabajo.

#### **5.4.3. COMPARACIÓN DEL EFECTO DE LA RADIACIÓN UVA vs RADIACIÓN UV(A+B)**

En este apartado comparamos los efectos que la radiación UVA tiene en la transmisión espectral del cristalino de cerdo, en comparación con los producidos por la radiación UV(A+B).

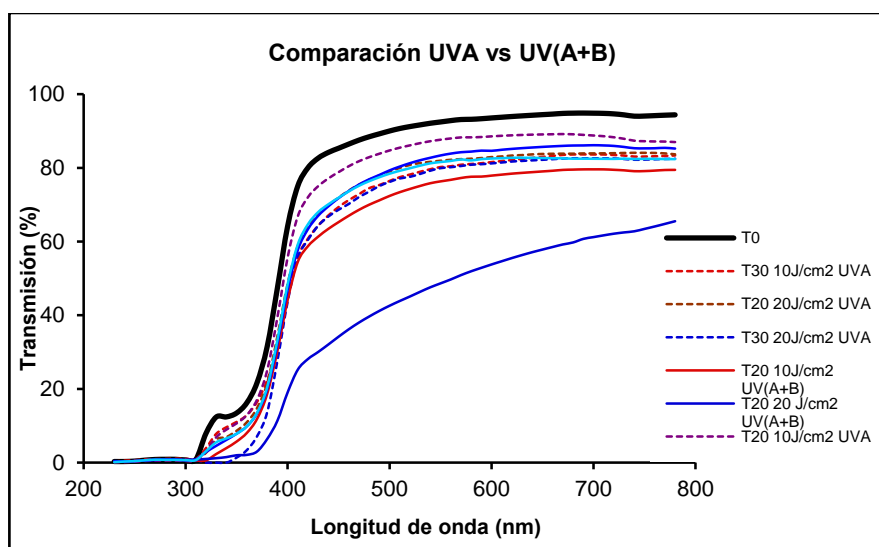
En la Figura 80 comparamos las curvas correspondientes al tiempo de exposición de 5 minutos con radiación UVA e intensidad  $20 \text{ J/cm}^2$  y con radiación UV(A+B) e intensidad  $10 \text{ J/cm}^2$ . Puede apreciarse la gran similitud entre ambas curvas ( $p > 0,1$ ), sin embargo esta semejanza no nos dice mucho debido al corto tiempo de exposición, que hace que tanto para un tipo de radiación como para el otro el efecto sobre la transmisión espectral sea muy débil y por consiguiente las curvas no se diferencian apenas de la curva correspondiente al cristalino no irradiado (T0).





**Figura 80.-** Comparación de dos cristalinos irradiados durante 5 minutos con UVA y UV(A+B) e intensidades de 20 y 10 J/cm<sup>2</sup> respectivamente.

Si ahora comparamos las exposiciones de 20 y 30 minutos y las dos intensidades correspondientes a cristalinos irradiados con UVA y las exposiciones de 10 y 20 minutos y las dos intensidades para los irradiados con UV(A+B) (Figura 81), vemos que en general los irradiados con UV(A+B) ven más afectadas sus curvas de transmisión, lo que es lógico dada su mayor energía y efectos biológicos.



**Figura 81.-** Comparación de varios cristalinos irradiados durante 10, 20 y 30 minutos con UVA y UV(A+B) e intensidades de 20 y 10 J/cm<sup>2</sup>.

En conclusión podemos deducir de nuestros resultados que la radiación UV(A+B) produce mayores efectos nocivos que la radiación UVA, tal y como se comprueba en la bibliografía estudiada, y que en general para las exposiciones e intensidades empleadas, afecta más el tiempo de exposición. Hay que hacer notar no obstante, que con radiación UV(A+B), tiempo de exposición 20 minutos e intensidad  $20 \text{ J/cm}^2$ , el inicio de formación de opacidades hace que la transmisión se deteriore enormemente.

#### **5.4.4. FORMACIÓN DE OPACIDADES**

Como hemos visto anteriormente, cuando irradiamos el cristalino con radiación UV(A+B) durante 20 minutos y con una intensidad de  $20 \text{ J/cm}^2$ , la transmisión del cristalino disminuye fuertemente debido a la presencia de opacidades (Figura 81).

En la Figura 82, pueden verse fotografías de cristalinos de cerdo obtenidas mediante lámpara de hendidura usando un fondo naranja para su mejor observación. La parte a de la Figura 82 muestra un cristalino de cerdo recién extraído. La Figura 82 b, muestra un cristalino de cerdo irradiado con una intensidad de  $20 \text{ J/cm}^2$  durante 20 minutos, donde puede apreciarse una catarata subcapsular anterior (CSA) de densidad leve. En la Figura 82 c, se aprecia una catarata densa CSA producida cuando el tiempo de exposición era de media hora y la intensidad de radiación  $20 \text{ J/cm}^2$ . En nuestra experiencia todas las cataratas producidas por radiación UV (A+B) fueron siempre CSA.

En la Figura 82 b y c, también pueden verse diferentes pliegues producidos por desecación del cristalino. Es decir, una exposición aguda y prolongada a la radiación UV deshidrata el cristalino. Esto es consecuente con un trabajo donde se determinó la influencia de la radiación UV en el cristalino midiendo su cantidad de agua. En sus resultados vieron que el contenido en agua varió con altas dosis de radiación, donde una absorción de agua marcada se correlaciona con la formación de una catarata severa (Michael and Brismar, 2001).

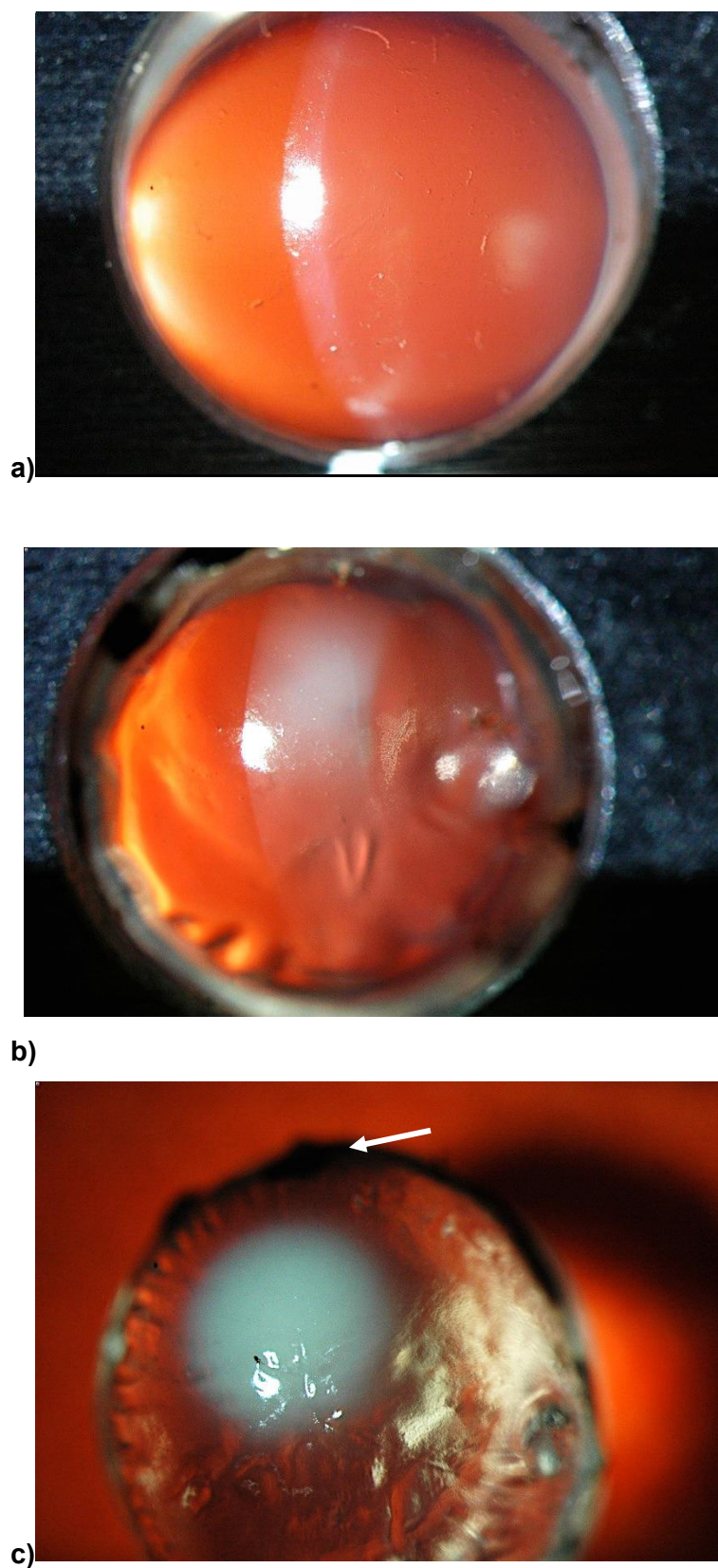
Otro hecho a tener en cuenta es que en ningún momento el cristalino llega a amarillearse de forma evidente. Es decir, con una exposición aguda a la radiación UV el cristalino pierde transmisión, aparece una catarata CSA, se deseca, pero no sufre el amarilleamiento que se describe en los cristalinos típicos de personas ancianas. En la

Figura 83 puede verse un cristalino recién extraído (a), otro irradiado con UV(A+B) durante 10 minutos (b), apreciándose las arrugas producidas por la desecación y finalmente un cristalino irradiado con UV(A+B) durante 20 minutos (c) donde empieza a apreciarse un principio de catarata subcapsular anterior, pero no llega a verse claramente un amarilleamiento.

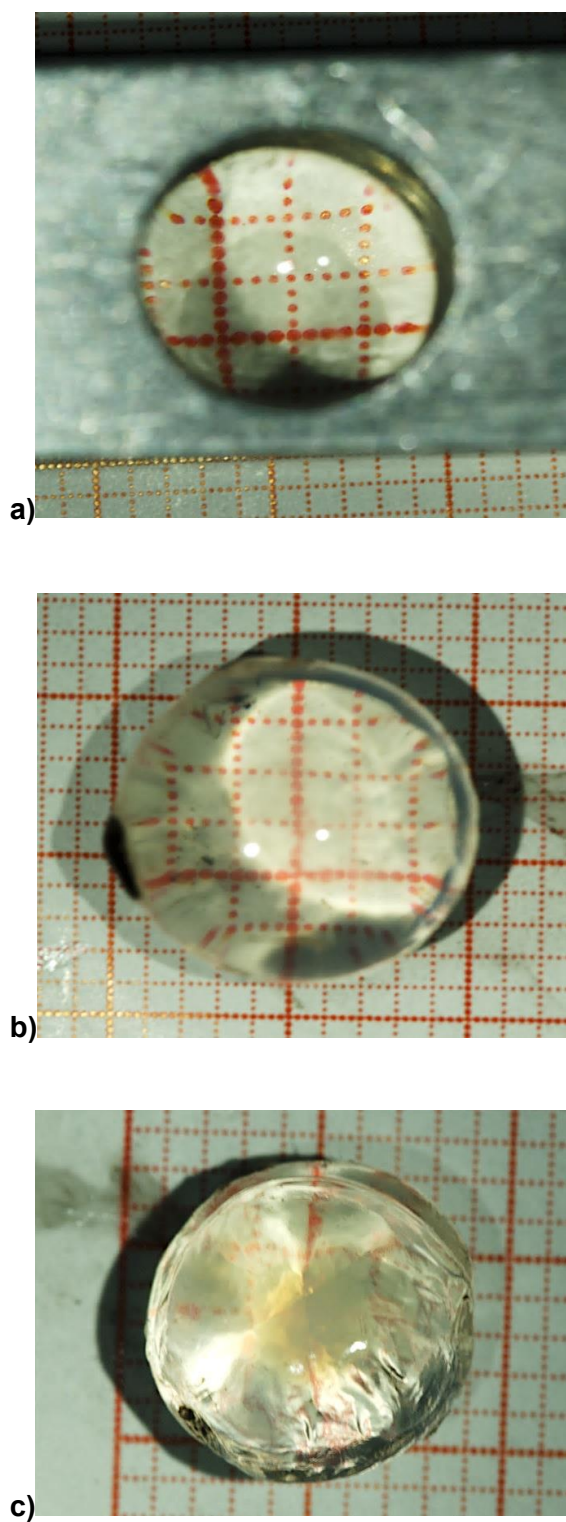
Pitts y su equipo (1977) estudiaron los efectos oculares de una banda de radiación UV comprendida entre 295 y 365 nm en el conejo. El criterio que utilizaron para determinar los daños provocados en el cristalino es la aparición de opacidades subcapsulares, nebulosidad capsular o estromal, opacidades estromales y aumento de la prominencia en la sutura anterior, siendo el intervalo de longitudes de onda más efectivo para producir opacidades el comprendido entre 295 y 315 nm. Evidentemente, este intervalo corresponde enteramente al ultravioleta B, que como sabemos es mucho más dañino para los seres vivos que el UVA. Al igual que ocurre en nuestro estudio, cuando irradiamos con radiación UV(A+B), es cuando se producen más daño y opacidades en el cristalino.

En el estudio de Galichanin y colaboradores (2010) se irradian ratas con UVB a 8 KJ/m<sup>2</sup> durante 15 minutos, observando a las 7 horas de la exposición los primeros cambios macroscópicos en forma de neblina que afectaba al epitelio, y concretamente a las suturas del cristalino. Tras 48 h, pudieron verse opacificaciones más claras sobre todo en la zona de ecuador. Esto se confirma en nuestro estudio, donde en la figura 83 (b) puede verse cómo un cristalino irradiado con UVB a 10 J/cm<sup>2</sup> durante 10 min, ya presenta una ligera neblina que puede observarse macroscópicamente. Estos autores describieron también una recuperación de la transparencia a las 336 h; en nuestro estudio no realizamos medidas durante tanto tiempo, aunque observamos una mejora de la transparencia del cristalino tras 30 min de la exposición con UVB (Figura 81).

Soderberg (1990), comprobó tras irradiar con UVB a 30 KJ/m<sup>2</sup> que la opacificación producida se debe inicialmente a un hinchamiento de las células epiteliales, para seguir en el córtex anterior, seguidamente si persiste la radiación, pasa a afectar al córtex posterior y finalmente al núcleo de la lente.



**Figura 82.-** Fotografías de cristalinos de cerdo. a) cristalino recién extraído. b) cristalino irradiado 20 minutos con  $I=20 \text{ J/cm}^2$ . Densidad leve (flecha). c) Densa catarata CSA producida por 30 minutos de exposición e  $I=20 \text{ J/cm}^2$ .



**Figura 83.-** *Cristalinos de cerdo. a) Sin irradiar. b) Irradiado 10 minutos con UV(A+B). c) Irradiado 20 minutos con UV(A+B).*

#### 5.4.5. COMPARACIÓN CON EL CRISTALINO HUMANO

La comparación de estos resultados con los datos que se tienen del cristalino humano son siempre discutibles. No obstante intentaremos extraer conclusiones que puedan extrapolarse al caso humano, pero teniendo siempre presente los siguientes hechos:

- I. Se comparan dos especies diferentes.
- II. La irradiación con UV que se ha llevado a cabo en este experimento sobre el cristalino del cerdo ha sido aguda. Es decir, intensa y en un corto espacio de tiempo, mientras que en el caso humano esta irradiación tiene lugar con baja intensidad y a lo largo de los años.
- III. La edad de los cerdos utilizados es de 6 meses, mientras que las cataratas que se suelen ver en humanos son de lentes de mayor edad.

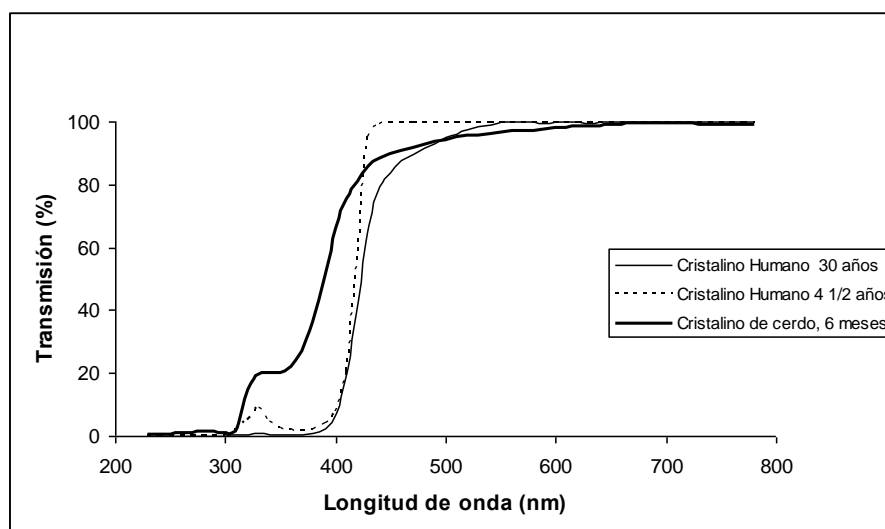
En el aspecto positivo tenemos que,

- I. El cristalino del cerdo es muy similar al humano y actualmente se está utilizando con mucha frecuencia como modelo de experimentación.
- II. Los cristalinos utilizados en este experimento son todos jóvenes y prácticamente iguales ya que proceden de cerdos genéticamente semejantes, alimentados de la misma manera, con una situación medioambiental similar y sacrificados todos a los seis meses. Así pues las variaciones en la transmisión espectral del cristalino que puedan producirse por acción de la radiación UV, serán debidas básicamente a la intensidad y tiempo de exposición de esta radiación. Esto evidentemente no puede realizarse con humanos ya que, aparte de que no se puede irradiar con UV a una persona, es muy difícil poder aislar el efecto de la radiación. En los estudios epidemiológicos que se han hecho con humanos (Cruickshanks et al., 1992; McCarty et al., 2000; Sasaki et al., 2003; Taylor et al., 1988; West, 1999), se ha escogido una amplia población y se ha intentado que sea lo más uniforme posible. Sin embargo a pesar de todo, es muy difícil poder aislar con precisión qué efectos son causados exclusivamente por la radiación

UV, ya que siempre se mezclan otros factores como edad, raza, factores genéticos, factores ambientales, patologías, estilo de vida, nutrición, tiempos de exposición, hábitos como fumar, alcohol, etc. que son exclusivos de cada uno de los individuos que participan en la muestra.

Teniendo siempre presentes estas circunstancias, podemos intentar comparar y extrapolar alguna de las conclusiones que se derivan de este estudio al caso humano.

Si comparamos la curva que muestra la transmisión espectral del cristalino del cerdo (Figura 43) con la correspondiente al cristalino humano (Boettner and Wolter, 1962) (Artigas et al., 2012b), podemos ver (Figura 84) que en la región del espectro visible la transmisión es prácticamente idéntica; sin embargo, en la región del ultravioleta es diferente.



**Figura 84.-** Comparación de la transmisión espectral del cristalino de cerdo con el humano. Curva del cristalino humano de 4 1/2 años adaptada Boettner&Wolter (Boettner y Wolter, 1962). Curva del cristalino humano de 30 años adaptada de Artigas et al, 2012.

#### *Región del espectro visible*

Aproximadamente a partir de 400 nm en adelante (espectro visible) la transmisión tanto del cristalino del cerdo como la del cristalino humano están por encima del 85%. Como sabemos con la edad el cristalino humano amarillea lo que significa una menor transmisión en las cortas longitudes de onda, por esta razón la curva de transmisión del cristalino del sujeto de 30 años decrece en el intervalo de 400-500 nm respecto de la curva

correspondiente al cristalino del niño de 4 años y medio. La curva del cristalino correspondiente al cerdo de 6 meses se sitúa en una posición intermedia, pero en cualquier caso podemos afirmar que tanto el cristalino humano como el de cerdo corresponden a un animal diurno, ya que transmiten fundamentalmente el espectro visible.

### *Región del ultravioleta*

Como se observa en la Figura 84, el cristalino del cerdo transmite en toda la región del ultravioleta A (315-380 nm) aproximadamente un 15%, filtrando completamente a partir de alrededor de los 320 nm todas las radiaciones, es decir no deja pasar el UVB (290-315 nm) ni el UVC (100-290 nm). Por el contrario, el cristalino humano no transmite prácticamente nada por debajo de 380 nm, es decir además de la radiación UVB y UVC también filtra la radiación UVA, presentando únicamente al nacer una pequeña ventana de aproximadamente un 10% de transmisión centrada en 320 nm tal y como se observa en la Figura 84 para la curva del niño, que va disminuyendo con la edad hasta prácticamente desaparecer.

En el cristalino del cerdo sucede algo parecido, ya que esa transmisión de alrededor del 15% que presentan los cristalinios jóvenes en el UVA, va desapareciendo conforme irradiamos dichos cristalinios con radiación UV. Efectivamente, si nos fijamos en la Figura 81 por ejemplo, vemos que conforme aumentan los tiempos de exposición y la intensidad de la radiación, en general va disminuyendo la transmisión en las cortas longitudes de onda (los azules), pero todavía más en las más cortas longitudes de onda, es decir en el UV (ver Tablas 4, 5, 7 y 8). Esto nos dice que la irradiación con radiación UV hace más opacos los cristalinios de cerdo a las cortas longitudes de onda y al ultravioleta, llegando, en muchos casos si la intensidad y tiempo de exposición son suficientes, a bloquear completamente el paso de la radiación UV.

Este hecho experimental, podría con las debidas reservas, compararse a la situación humana donde la ventana centrada en la longitud de onda de 320 nm, que presenta al nacer el cristalino humano y que desaparece con los años, podría aventurarse que uno de los factores que influyen en este proceso es la radiación UV presente en la luz solar. Es decir, la propia radiación UV provocaría ese descenso en la transmisión del cristalino en la zona precisamente del ultravioleta, llegando en algunos casos a bloquearla completamente.

### *Desarrollo y tipo de cataratas*



En nuestro estudio, la exposición intensa y aguda del cristalino aislado del cerdo *in vitro* a una radiación UV (A+B) de longitud de onda similar a la que llega a la superficie de la tierra procedente del sol, produce siempre una catarata subcapsular anterior (CSA). Por el contrario, en humanos de acuerdo con el Chesapeake Bay Waterman Study (Taylor et al., 1988) y con el Beaver Dam Eye Study (Cruickshanks et al., 1992), se produce un aumento del riesgo de sufrir una opacidad cortical conforme el ojo es expuesto a radiación UV.

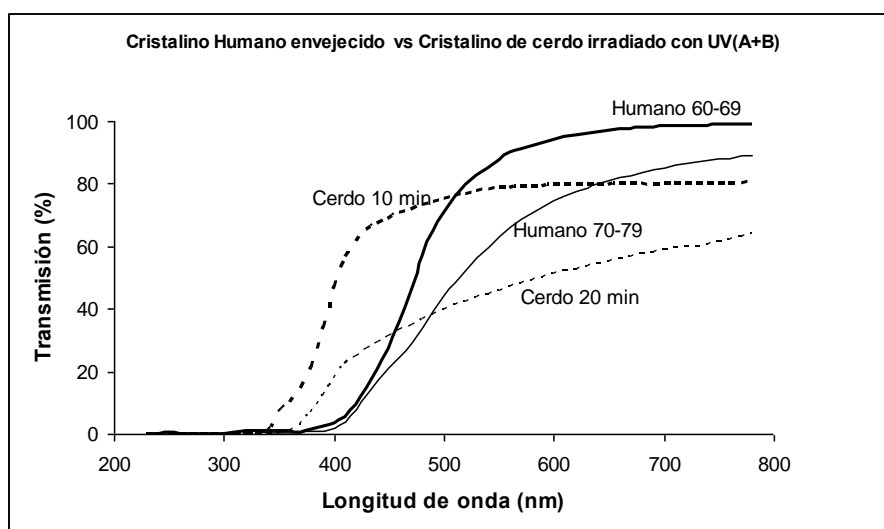
En este aspecto es difícil hacer una comparación directa, ya que en nuestro caso la CSA producida es debida exclusivamente a la radiación UV, mientras que en el caso de humanos las evidencias provienen de un estudio epidemiológico en el que potencialmente influyen muchos factores. En el caso del Chesapeake Bay Waterman Study (Taylor et al, 1988), por ejemplo, el estudio se realizó sobre 838 pescadores con una media de edad de 53 años, calculándose la exposición ocular anual a partir de los 16 años lo que se combinó con una detallada historia ocupacional. Se encontró una relación significativa entre las opacidades corticales y la exposición a UVB y ninguna relación entre cataratas nucleares y radiación UVB, como tampoco entre la exposición a la radiación UVA y cualquier tipo de catarata.

Vemos entonces que, aunque a primera vista parece que la comparación entre los resultados de nuestro experimento y los de los estudios epidemiológicos en humanos podría hacerse fácilmente en algún sentido, esto no es así. Por tanto, únicamente podemos afirmar que la exposición aguda de radiación UV(A+B) sobre el cristalino de cerdo *in vitro* produce siempre una catarata subcapsular anterior.

Por otra parte ya hemos apuntado que en nuestro experimento el cristalino del cerdo no llega a oscurecerse aunque sea fuertemente irradiado con UV(A+B). Esto se observa claramente en las curvas de transmisión, ya que cuando el cristalino es irradiado, aunque la transmisión descienda un poco más en las cortas longitudes de onda, no lo hace lo suficiente como para que muestre un amarilleamiento.

Sin embargo es un hecho constatado que el cristalino de las personas mayores está generalmente oscurecido, variando el color del amarillo hacia el marrón (naranja oscurecido)(Artigas et al, 2012). También se ha demostrado que este amarilleamiento, aunque puede aparecer antes, depende de la edad sólo a partir de los 60 años más o menos (Artigas et al, 2012), y que uno de los principales factores que contribuyen a este oscurecimiento es precisamente la radiación UV.

Si comparamos las curvas de transmisión espectral de un cristalino humano envejecido con la de un cristalino de cerdo irradiado con UV(A+B) (Figura 85), vemos que las dos curvas han disminuido más en las cortas longitudes de onda (azules), pero mucho más en el cristalino humano en comparación con su transmisión en el espectro visible, lo que demuestra su amarilleamiento.



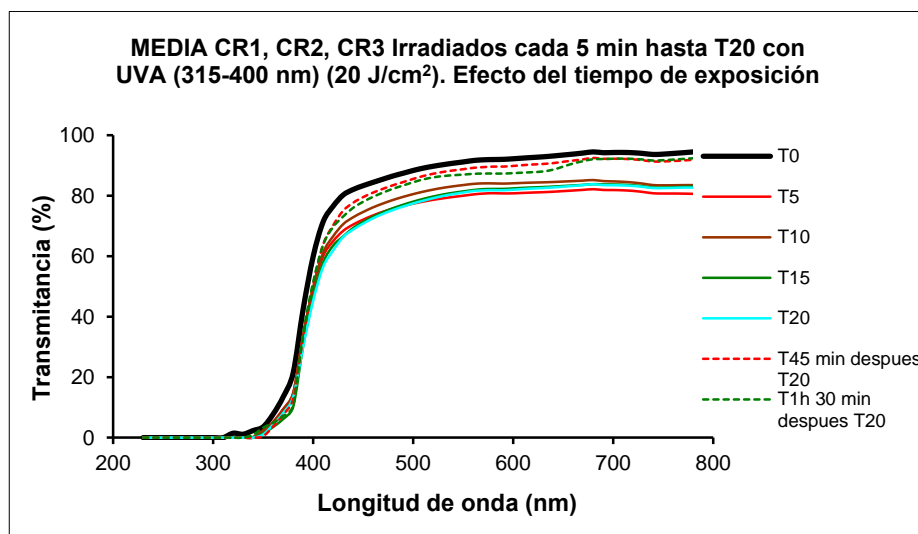
**Figura 85.-** Comparación entre la transmisión espectral de cristalinos humanos envejecidos. Las líneas continuas corresponden a medias de cristalinos humanos comprendidos entre 60-69 años y 70-79 años (adaptado de Artigas et al, 2012). Las líneas discontinuas corresponden a cristalinos de cerdo irradiados con UV(A+B) e intensidad  $20 \text{ J/cm}^2$  y durante 10 y 20 minutos.

#### 5.4.6. ESTUDIO PRELIMINAR DE LA POSIBLE REGENERACIÓN DEL CRISTALINO TRAS LA RADIACIÓN UV

La formación de cataratas inducida por UV se relaciona con cierto grado de apoptosis celular inducida por la radiación. (Li et al., 1995) En este estudio se quiso comprobar si este efecto de muerte celular era temporal o por el contrario irreversible.

Para ello, se midió la transmisión de los cristalinos irradiados con UVA y UVB tras los 20 min. En concreto se midió a los 45 minutos de T20 y a la hora y media de T20 para UVA, y a los 30 minutos de T20 y a la hora y media de T20 para UVB.

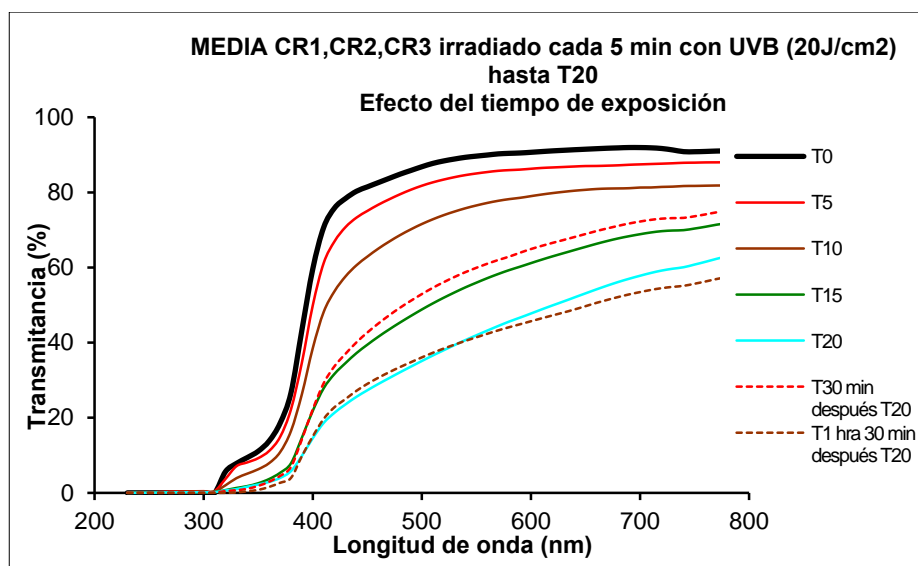
Los resultados para la radiación UVA se muestran en la Figura 86, donde puede observarse cómo la transmisión del cristalino se reduce considerablemente tras la radiación UV, pero pasados 10 minutos, el cristalino recupera parte de su transparencia.



**Figura 86.** Transmisión del ojo de cerdo tras radiación UVA (315-400nm) y medida en diferentes tiempos a los 0, 5, 10 20, 65 y 110 minutos de la exposición a los rayos UVA.

Para el caso de la radiación UVB se irradiaron los cristalinos y se realizaron medidas en T0, T5, T10, T15 y T20, para posteriormente medir a los 30 minutos de T20 (T50) y a la hora y media (T110).

Los resultados de este experimento se reflejan en la figura 87, donde se observa como la transmisión decrece hasta T20, y luego recupera parte de la transmisión en T50 para volver a disminuir en T110.



**Figura 87.** Transmisión de cristalinos irradiados con UVB y medida en diferentes tiempos.

En la bibliografía se estudia este fenómeno en diferentes investigaciones (Fris et al., 2008; Galichanin et al., 2010; Gwon, 2006; Kim and Koh, 2011; Li et al., 1995; Michael and Brismar, 2001; Oriowo et al., 2001; Pitts et al., 1977; Soderberg, 1988; Youn et al., 2011).

La radiación UVA induce cambios celulares que derivan (según la dosis de radiación y tiempos) en muerte celular. Sin embargo, la radiación UVB produce alteraciones en el ADN, e induce la muerte celular directa (Youn *et al*, 2011). Como ya hemos comprobado en nuestro estudio, la radiación UVB produce un daño mayor con menor dosis y tiempo que la UVA.

En el trabajo de Oriowo y colaboradores (2001), se comprobó lo que ya describieron otros autores (Pitts et al., 1977): la regeneración de la lente del daño UV depende de la dosis irradiada y la dosis umbral de la misma (dosis a partir de la cual se produce una catarata) para la especie. Comprobaron que en el caso de la radiación UVA, utilizando el doble de la dosis umbral, se observaba una recuperación parcial. En el caso de UVB, con cinco veces la dosis umbral, el daño era irreversible. Por tanto, el proceso de

recuperación de la lente ocurre con una dosis de UV umbral o por debajo del umbral que se haya establecido para la especie. Hay que notar, que al igual que nuestro trabajo, este estudio se realizó *in vitro*, por lo tanto, es posible cierto grado de recuperación de las células epiteliales de la lente, incluso en el ojo enucleado. Esto se explica por la condición de aislamiento que tiene el cristalino del resto del globo ocular, no dependiendo prácticamente de las demás estructuras para su metabolismo homeostático.

Tras una exposición a radiación UV próxima al umbral, la mayoría de lentes tienen la capacidad de recuperarse, no así las sometidas a una alta radiación, que forman opacidades permanentes. La capacidad de regeneración ocurre gracias al epitelio de la lente. Si ocurre un daño leve, las células epiteliales fagocitan las células afectadas y la lente recupera su transparencia. También se observa que una dosis de radiación cercana al umbral, produce una disminución en el contenido de agua de la lente, sin embargo, una dosis alta produce una catarata por sobrehidratación (Michael y Brismar, 2001).

En un trabajo de Li y colaboradores (1995), se demostró que en la formación de todos los tipos de catarata en humanos existe un proceso de apoptosis de las células epiteliales, que ocurre tras un daño al ADN celular. En otro trabajo de este mismo grupo, comprobaron tras irradiar ojos de ratas *in vitro* con una dosis de UVB que a las 5h más del 50% de las células epiteliales estaban apoptóticas, y que a las 24h, todas las células estaban muertas, dejando a la lente obviamente sin capacidad de regeneración (Li *et al*, 1996). Esto mismo, también lo estudió Galichanin *et al* (Galichanin *et al.*, 2010), que al irradiar las ratas observó signos de apoptosis tras sólo 1h tras la exposición, daño epitelial a las 48h, y sorprendentemente la regeneración completa de la lente en 14 días. En nuestro trabajo, no medimos tiempos tan largos y tan sólo observamos una ligera mejoría de la transmisión tras media hora de la exposición a la radiación, mucho más evidente con radiación UVA, donde la mejoría de transmisión perduró durante hora y media; sin embargo con radiación UVB, tras hora y media la transmisión volvió a disminuir. Consideramos interesante determinar la dosis umbral para la especie porcina y medir en tiempos largos la regeneración de la lente en términos de transmisión y apoptosis, en futuras investigaciones.

## 5.7. REFERENCIAS

- Ambach, W., Blumthaler, M., Schöpf, T., Ambach, E., Katzgraber, F., Daxecker, F., Daxer, A., 1994. Spectral transmission of the optical media of the human eye with respect to keratitis and cataract formation. *Doc. Ophthalmol.* 88, 165–173.
- Artigas, J.M., Capilla, P., Felipe, A., Pujol, J., 1995. *Óptica fisiológica. Psicofísica de la Visión.*, First. ed. McGraw-Hill Interamericana, Madrid.
- Artigas, J.M., Felipe, A., Navea, A., Artigas, C., Menezo, J.L., 2012a. Ultraviolet radiation at Mediterranean latitudes and protection efficacy of intraocular lenses. *J Fr Ophtalmol* 36, 23–28.
- Artigas, J.M., Felipe, A., Navea, A., Fandino, A., Artigas, C., 2012b. Spectral transmission of the human crystalline lens in adult and elderly persons: color and total transmission of visible light. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 53, 4076–4084.
- Ayala, M.N., Michael, R., Soderberg, P.G., 2000. Influence of exposure time for UV radiation-induced cataract. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41, 3539–3543.
- Boettner, E.A., Wolter, J.R., 1962. Transmission of the Ocular Media. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1, 776–783.
- Bowmaker, J.K., 2008. Evolution of vertebrate visual pigments. *Vision Res.* 48, 2022–2041.
- Bunsen, R., Roscoe, H., 1862. Photochemische Untersuchungen. *Ann. Phys.* 193, 529–562.
- Čejka, Č., Pláteník, J., Buchal, R., Guryca, V., Širc, J., Vejražka, M., Crkovská, J., Ardan, T., Michálek, J., Brůnová, B., Čejková, J., 2009. Effect of two different UVA doses on the rabbit cornea and lens. *Photochem. Photobiol.* 85, 794–800.
- Chandler, M.J., Smith, P.J., Samuelson, D.A., MacKay, E.O., 1999. Photoreceptor density of the domestic pig retina. *Vet Ophthalmol* 2, 179–184.
- Cruikshanks, K.J., Klein, B.E., Klein, R., 1992. Ultraviolet light exposure and lens opacities: the Beaver Dam Eye Study. *Am J Public Heal.* 82, 1658–1662.
- Dong, X., Ayala, M., Lofgren, S., Soderberg, P.G., 2003. Ultraviolet radiation-induced cataract: age and maximum acceptable dose. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44, 1150–1154.
- Dong, X., Lofgren, S., Ayala, M., Soderberg, P.G., 2005. Maximum tolerable dose for avoidance of cataract induced by ultraviolet radiation-B for 18 to 60 week old rats. *Exp Eye Res* 80, 561–566.
- Douglas, R.H., 1986. Photopic spectral sensitivity of a teleost fish, the roach (*Rutilus rutilus*), with special reference to its ultraviolet sensitivity. *J Comp Physiol A* 159, 415–421.
- Douglas, R.H., Jeffery, G., 2014. The spectral transmission of ocular media suggests ultraviolet sensitivity is widespread among mammals. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 281.
- Emmerton, J., Schwemer, J., Muth, I., Schlecht, P., 1980. Spectral transmission of the ocular media of the peigon (*Columba livia*). *Invest Ophthalmol Vis Sci* 19, 1382–1387.

- Fris, M., Čejková, J., Midelfart, A., 2008. The effect of single and repeated UVB radiation on rabbit lens. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 246, 551–558.
- Gaillard, E.R., Zheng, L., Merriam, J.C., Dillon, J., 2000. Age-related changes in the absorption characteristics of the primate lens. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41, 1454–1459.
- Galichanin, K., Lofgren, S., Bergmanson, J., Soderberg, P., 2010. Evolution of damage in the lens after in vivo close to threshold exposure to UV-B radiation: cytomorphological study of apoptosis. *Exp Eye Res* 91, 369–377.
- Giblin, F.J., Leverenz, V.R., Padgaonkar, V.A., Unakar, N.J., Dang, L., Lin, L.R., Lou, M.F., Reddy, V.N., Borchman, D., Dillon, J.P., 2002. UVA light in vivo reaches the nucleus of the guinea pig lens and produces deleterious, oxidative effects. *Exp. Eye Res.* 75, 445–458.
- Goldsmith, T.H., 1980. Hummingbirds see near ultraviolet light. *Science* (80-. ). 207, 786–788.
- Gwon, A., 2006. Lens regeneration in mammals: a review. *Surv. Ophthalmol.* 51, 51–62.
- Harosi, F.I., Hashimoto, Y., 1983. Ultraviolet visual pigment in a vertebrate: a tetrachromatic cone system in the dace. *Science* (80-. ). 222, 1021–1023.
- Hawryshyn, C.W., Beauchamp, R., 1985. Ultraviolet photosensitivity in goldfish: an independent u.v. retinal mechanism. *Vis. Res* 25, 11–20.
- Hendrickson, A., Hicks, D., 2002. Distribution and density of medium- and short-wavelength selective cones in the domestic pig retina. *Exp Eye Res* 74, 435–444.
- Jacobs, G.H., Neitz, J., Deegan 2nd, J.F., 1991. Retinal receptors in rodents maximally sensitive to ultraviolet light. *Nature* 353, 655–656.
- Jonas, J.B., Schneider, U., Naumann, G.O., 1992. Count and density of human retinal photoreceptors. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 230, 505–510.
- Kessel, L., Eskildsen, L., Lundeman, J.H., Jensen, O.B., Larsen, M., 2011. Optical effects of exposing intact human lenses to ultraviolet radiation and visible light. *BMC Ophthalmol* 11, 41.
- Kessel, L., Lundeman, J.H., Herbst, K., Andersen, T.V., Larsen, M., 2010. Age-related changes in the transmission properties of the human lens and their relevance to circadian entrainment. *J. Cataract Refract. Surg.* 36, 308–12.
- Kim, J., Ko, J., Ko, A., Lee, H., Kim, M., Wee, W., Lee, R., Fulcher, S., Oh, J., 2014. TSG-6 protects corneal endothelium from transcorneal cryoinjury in rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 55, 4905–12.
- Kim, S.T., Koh, J.W., 2011. Mechanisms of apoptosis on human lens epithelium after ultraviolet light exposure. *Korean J Ophthalmol* 25, 196–201.
- Kivell, T.L., Doyle, S.K., Madden, R.H., Mitchell, T.L., Sims, E.L., 2009. An interactive method for teaching anatomy of the human eye for medical students in ophthalmology clinical rotations. *Anat Sci Educ* 2, 173–178.

- Lei, B., Yao, G., 2006. Spectral attenuation of the mouse, rat, pig and human lenses from wavelengths 360 nm to 1020 nm. *Exp Eye Res* 83, 610–614.
- Li, W.C., Kuszak, J.R., Dunn, K., Wang, R.R., Ma, W., Wang, G.M., Spector, A., Leib, M., Cotliar, A.M., Weiss, M., et al., 1995. Lens epithelial cell apoptosis appears to be a common cellular basis for non-congenital cataract development in humans and animals. *J Cell Biol* 130, 169–181.
- McCarty, C.A., Nanjan, M.B., Taylor, H.R., 2000. Attributable risk estimates for cataract to prioritize medical and public health action. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41, 3720–3725.
- Michael, R., 2000. Development and repair of cataract induced by ultraviolet radiation. *Ophthalmic Res* 32 Suppl 1, ii–iii; 1–44.
- Michael, R., Brismar, H., 2001. Lens growth and protein density in the rat lens after in vivo exposure to ultraviolet radiation. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42, 402–408.
- Michael, R., Vrensen, G.F., van Marle, J., Gan, L., Soderberg, P.G., 1998. Apoptosis in the rat lens after in vivo threshold dose ultraviolet irradiation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39, 2681–2687.
- Middleton, S., 2010. Porcine ophthalmology. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 26, 557–72.
- Mody Jr., V.C., Kakar, M., Elfving, A., Soderberg, P.G., Lofgren, S., 2006. Ultraviolet radiation-B-induced cataract in albino rats: maximum tolerable dose and ascorbate consumption. *Acta Ophthalmol Scand* 84, 390–395.
- Mody Jr., V.C., Kakar, M., Soderberg, P.G., Lofgren, S., 2012. High lenticular tolerance to ultraviolet radiation-B by pigmented guinea-pig; application of a safety limit strategy for UVR-induced cataract. *Acta Ophthalmol* 90, 226–230.
- Mohamed, A., Gilliland, K.O., Metlapally, S., Johnsen, S., Costello, M.J., 2013. Simple fixation and storage protocol for preserving the internal structure of intact human donor lenses and extracted human nuclear cataract specimens. *Mol. Vis.* 19, 2352–9.
- Neitz, J., Jacobs, G.H., 1989. Spectral sensitivity of cones in an ungulate. *Vis Neurosci* 2, 97–100.
- Okuno, T., Ueda, T.N., Ueda, T., Yasuhara, H., Koide, R., 2012. Ultraviolet Action Spectrum for Cell Killing of Primary Porcine Lens Epithelial Cells. *J. Occup. Health* 54, 181–186.
- Oriowo, O.M., Cullen, A.P., Chou, B.R., Sivak, J.G., 2001. Action spectrum and recovery for in vitro UV-induced cataract using whole lenses. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42, 2596–2602.
- Oriowo, O.M., Cullen, A.P., Sivak, J.G., 2002. Impairment of eye lens cell physiology and optics by broadband ultraviolet A-ultraviolet B radiation. *Photochem. Photobiol.* 76, 361–367.
- Perry, R.J., McNaughton, P.A., 1991. Response properties of cones from the retina of the tiger salamander. *J Physiol* 433, 561–587.



- Pitts, D.G., Cullen, A.P., Hacker, P.D., 1977. Ocular effects of ultraviolet radiation from 295 to 365 nm. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 16, 932–939.
- Salcedo, E., Zheng, L., Phistry, M., Bagg, E.E., Britt, S.G., 2003. Molecular basis for ultraviolet vision in invertebrates. *J. Neurosci.* 23, 10873–10878.
- Sasaki, H., Kawakami, Y., Ono, M., Jonasson, F., Shui, Y.B., Cheng, H.M., Robman, L., McCarty, C., Chew, S.J., Sasaki, K., 2003. Localization of cortical cataract in subjects of diverse races and latitude. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44, 4210–4214.
- Soderberg, P.G., 1988. Acute cataract in the rat after exposure to radiation in the 300 nm wavelength region. A study of the macro-, micro- and ultrastructure. *Acta Ophthalmol* 66, 141–152.
- Soderberg, P.G., 1990a. Experimental cataract induced by ultraviolet radiation. *Acta Ophthalmol Suppl* 1–75.
- Soderberg, P.G., 1990b. Development of light dissemination in the rat lens after in vivo exposure to radiation in the 300-nm wavelength region. *Ophthalmic Res* 22, 271–279.
- Stark, W.S., Tan, K.E., 1982. Ultraviolet light: photosensitivity and other effects on the visual system. *Photochem Photobiol* 36, 371–380.
- Taylor, H.R., West, S.K., Rosenthal, F.S., Munoz, B., Newland, H.S., Abbey, H., Emmett, E.A., 1988. Effect of ultraviolet radiation on cataract formation. *N Engl J Med* 319, 1429–1433.
- Tsukahara, N., Tani, Y., Kikuchi, H., Sugita, S., 2014. Light transmission of the ocular media in birds and mammals. *J. Vet. Med. Sci.* 76, 93–5.
- Turner, P.L., Mainster, M.A., 2008. Circadian photoreception: ageing and the eye's important role in systemic health. *Br. J. Ophthalmol.* 92, 1439–1444.
- Varma, S.D., Kovtun, S., Hedge, K.R., 2011. Role of UV irradiation and oxidative stress in cataract formation. Medical prevention by nutritional antioxidants and metabolic agonists. *Eye Contact Lens* 37, 233–245.
- Weale, R.A., 1983. Senile cataract. The case against light. *Ophthalmology* 90, 420–423.
- West, S., 1999. Ocular ultraviolet B exposure and lens opacities: a review. *J Epidemiol* 9, S97–101.
- Youn, H.Y., McCanna, D.J., Sivak, J.G., Jones, L.W., 2011. In vitro ultraviolet-induced damage in human corneal, lens, and retinal pigment epithelial cells. *Mol Vis* 17, 237–246.



## **CONCLUSIONES**



## CONCLUSIONES

1. El cristalino de cerdo deja pasar todo el espectro visible y aproximadamente un 15% del UV.
2. La transmisión del cristalino de cerdo no sufre variaciones significativas en una hora tras su extracción del ojo enucleado. El método de conservación que mejor preserva la transmisión del cristalino es la criocongelación a  $-80^{\circ}$ .
3. La radiación UVA provoca una mayor disminución en la transmisión del cristalino de cerdo en las cortas longitudes de onda (los azules), pero sobretodo en el UV. La adición de UVB a la radiación de exposición, acelera la disminución en la transmisión en la región del UVA en los tiempos utilizados.
4. En nuestro estudio se comprueba la ley de reciprocidad fotoquímica de Bunsen-Roscoe en el rango de intensidades y tiempos utilizados.
5. La transmisión del cristalino experimenta una mejoría parcial tras la irradiación con UV. Tras la radiación con UVA, se observa una recuperación tras 30 minutos y se mantiene después de hora y media. Sin embargo, en el caso de la radiación UVB, tras la recuperación a los 30 min, vuelve a disminuir a la hora y media.
6. La exposición aguda a radiación UV (A+B) sobre el cristalino de cerdo in vitro produce una catarata subcapsular anterior.
7. Tras la comparación del cristalino de cerdo con el cristalino humano, se observa que la transmisión es muy similar en la región del espectro visible, pero el cerdo transmite parte de UVA mientras que el humano no transmite prácticamente nada por debajo de 380 nm.



## **RESUMEN Y ABSTRACT**





## RESUMEN

La radiación ultravioleta (UV) es uno de los factores más influyentes en la formación de opacidades en el cristalino tanto en humanos como en animales. El efecto de la radiación sobre un ser vivo depende de tres factores: el tipo de radiación, su intensidad y el tiempo de exposición. En la bibliografía existen estudios tanto in vivo como in vitro realizados en diferentes especies que tratan el efecto de la radiación UV en el cristalino, pero ninguno en la lente intacta de cerdo in vitro. El cerdo es un animal que desde hace 20 años ha empezado a considerarse en investigación oftalmológica debido a su similitud filogenética con el ser humano.

En nuestro estudio hemos dispuesto de 75 cristalinos de cerdo y se realizaron diferentes experimentos. Como principal estudio, se expusieron algunos cristalinos a radiaciones UVA y UVB a diferentes intensidades (10 y 20 J/cm<sup>2</sup>) y tiempos entre 0 y 30 minutos, para estudiar sus efectos en la transmisión espectral. Además, se hicieron otros experimentos paralelos: se estudiaron distintos métodos de conservación de la lente explantada, se estableció la curva de transmisión espectral del cristalino de cerdo, y se hizo un estudio preliminar sobre la regeneración del cristalino tras la irradiación con radiación ultravioleta.

Los resultados mostraron que cuando se irradia el cristalino con radiación UV, el daño producido en la lente es directamente proporcional a la intensidad y el tiempo, es decir, cuanta más intensidad más daño; y con una misma intensidad, cuanto más se prolonga la radiación más lesiones produce en la lente. También se comprobó que la radiación UVB es más dañina que la UVA, y por tanto necesita menos intensidad para producir el mismo daño. Por otra parte, la curva de transmisión del cristalino de cerdo, deja pasar todo el espectro visible y aproximadamente un 15% del UV. Por otro lado, la transmisión del cristalino de cerdo no sufre variaciones significativas en una hora tras su extracción del ojo enucleado. El método de conservación que mejor preserva la transmisión del cristalino es la criocongelación a -80°. Finalmente, se observó una ligera recuperación de la transmisión del cristalino tras hora y media de su exposición a radiación UVA, y sólo tras media hora en el caso de UVB, donde después la curva volvió a disminuir.



## ABSTRACT

UV radiation is one of the most influential factors affecting the formation of opacities in the crystalline, both in humans and animals. The effect of radiation on a living organism depends on three factors: type of radiation, intensity and time of exposition. Previous work in literature shows studies both in vivo and in vitro of the effect of UV radiation on different species, but none of them study the effect on an intact lens of a pig. A pig is an animal that since now 20 years has been considered for ophthalmological research due to the phylogenetic similarities with humans.

In our study, we have disposed of 75 crystallines of pigs for several experiments. In the main experiment, the crystalline of the pig was exposed to UVA and UVB radiation at different intensities (10 y 20 J/cm<sup>2</sup>) and exposure times ranging 0 to 30 minutes. The goal of these experiments is to observe the influence of UV radiation on the spectral transmittance of the lens. In parallel, several other factors were studied that we thought could be influential to the results of the work. Some preservation methods of the extracted lens were studied to observe if they would modify the spectral transmission. Additionally, the spectral transmission curve for the pig lens was established and compared with the human lens. Finally, a preliminary study of the crystalline regeneration after UV irradiation was performed.

Results indicate that when the crystalline is irradiated with UV light, the damage caused on the lens is directly proportional to the intensity and the time of exposition. As the intensity or the time of exposition increases the damage increases. UVB is more harmful for the crystalline than UVA, as it was observed that less intensity is needed to produce the same damage. The spectral transmittance curve of the pig shows that all visible spectrum is transmitted and also around 15% of UV radiation. Moreover, the transmittance of the crystalline suffers no significant variations after an hour of its explantation without the need of any preservation method. If longer times are needed, the best method of preservation of the spectral transmission of the lens is cryo-freezing at -80°C. The study showed a light regeneration of the transmission of the lens one hour and a half after exposure to UVA radiation, and only 30 minutes after UVB.



## **FUTURAS INVESTIGACIONES**



## FUTURAS INVESTIGACIONES

- Irradiar el globo ocular completo, no solo la lente, para determinar la influencia de los medios oculares en la formación de cataratas en el ojo de cerdo.
- Estudiar la posible respuesta sistémica en la formación de cataratas que observa Soderberg (1990) en su trabajo.
- Investigar el daño producido por la radiación ultravioleta en el cristalino, cuantificando el estrés oxidativo y el grado de apoptosis celular, así como la posible regeneración que observan diferentes autores en otras especies.
- Irradiar lentes de cerdo de diferentes edades, para observar posibles cambios en la curva de transmisión y la influencia de la radiación UV.
- Establecer la dosis umbral para las radiaciones UVA y UVB para la especie porcina.





## **ANEXO I. TRABAJOS PUBLICADOS**



Artigas C, Navea A, López-Murcia MM, Felipe A, Desco C, Artigas JM. Spectral transmission of the pig lens: Effect of ultraviolet A+B radiation. J Fr Ophtalmol. 2014 Dec;37(10):773-9.

Artigas, J.M., Felipe, A., Navea, A., Artigas, C., Menezo, J.L. Ultraviolet radiation at Mediterranean latitudes and protection efficacy of intraocular lenses. J Fr Ophtalmol 2012 36, 23–28.

Artigas, J.M., Felipe, A., Navea, A., Fandino, A., Artigas, C. Spectral transmission of the human crystalline lens in adult and elderly persons: color and total transmission of visible light. Invest Ophthalmol Vis Sci 2012 53, 4076–4084.

Artigas C, Redondo JI, López-Murcia MM. Effects of intravenous administration of dexmedetomidine on intraocular pressure and pupil size in clinically normal dogs. Vet Ophthalmol. 2012 Mar;15 Suppl 1:79-82.

Artigas JM, Felipe A, Navea A, Artigas C, García-Domene MC. 2011. Spectral transmittance of intraocular lenses under natural and artificial illumination: criteria analysis for choosing a suitable filter. Ophthalmology. 2011 Jan;118(1):3-8.