

---

## Peróxido de Hidrógeno en el Humor Acuoso: 1992-1997

SIXTO GARCÍA-CASTIÑEIRAS, MD, PhD

---

**RESUMEN.** Se examina el conocimiento que existía en 1991 sobre peróxido de hidrógeno en el humor acuoso. Este conocimiento se pone en perspectiva tras el hallazgo del autor, publicado en 1992, de que el método usado para establecer la concentración de peróxido de hidrógeno en el humor acuoso genera ese compuesto durante el tiempo que toma hacer el análisis. Esto es debido a que el fenol que se utiliza en el método para detectar peróxido, diclorofenol indofenol (DCPIP), se autooxida espontáneamente en presencia de oxígeno. Se concluyó entonces que la concentración de peróxido de hidrógeno en el humor acuoso no puede ser mayor de aproximadamente 0.3  $\mu\text{M}$ , el límite de detección del método analítico usado. También se concluyó en ese momento que la afirmación comunmente encontrada en la literatura

de que el peróxido del humor acuoso deriva del abundante ascorbato presente en ese compartimento ocular está exclusivamente basada en el uso del método del DCPIP y bien podría deberse a un artefacto del propio método. Lo mismo aplicaría a la afirmación de que los niveles de peróxido en las cataratas seniles humanas son muy elevados. Se comenta la notable resistencia con que los resultados y conclusiones del autor están siendo acogidos y se discute el contenido de una presentación hecha en la reunión anual de ARVO de 1997 en que una parte importante de estos resultados y conclusiones se verifica plenamente, lo que podría dar lugar a que se comience pronto a aceptar el resto. *Palabras clave:* Peróxido de hidrógeno, Composición humor acuoso, Método del diclorofenol indofenol, Cataratas, Ascorbato.

---

**E**n la 25ª Convención de esta Sociedad en 1993 presenté un trabajo que había completado en 1991 sobre composición del humor acuoso, específicamente relacionado con los niveles de peróxido de hidrógeno(1). La publicación de este trabajo, por sus implicaciones, causó un notable revuelo en la comunidad científica concernida, que aún perdura, y en el que no ha faltado incluso la ocasional reacción intemperada tan poco apropiada para lo científico. Como lo habitual es que nuestro trabajo de investigación no llegue a crear tales marejadas, me pareció interesante y oportuno reevaluar la situación en este momento, cinco años más tarde de la

publicación original, y hacer un análisis lo más objetivo posible de la misma, para aprovechar las derivadas enseñanzas y redirigir nuestros esfuerzos investigativos.

**Metabolismo de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .** Muchas células y tejidos están produciendo un flujo continuo de especies reactivas de oxígeno, particularmente superóxido y peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Se trata de productos de reacciones enzimáticas y vías metabólicas, de la cadena respiratoria, de fenómenos de autooxidación, reacciones fotoquímicas, etc., muchas de las cuales tienen lugar a nivel microsomal y mitocondrial (Fig. 1). Estas especies reactivas de oxígeno constituyen, pues, metabolitos normales de las células y, aunque podrían tener funciones fisiológicas muy específicas, como acción bactericida en respuesta a una infección y posiblemente otras que aún desconocemos total o parcialmente, por lo general se les tiende a considerar más bien como productos secundarios indeseados de las reacciones mencionadas (2).

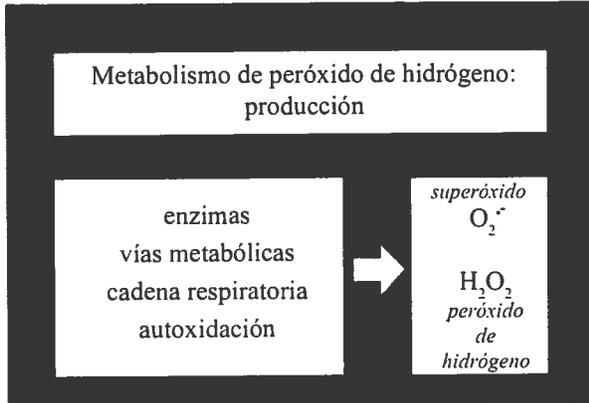
El organismo está preparado para descartar estos metabolitos mediante enzimas tales como catalasas, peroxidases y dismutasas de superóxido (Fig. 2). El metabolito primario en muchos casos es el superóxido,

---

De los Departamentos de Oftalmología y Bioquímica, Escuela de Medicina, Recinto de Ciencias Médicas, Universidad de Puerto Rico, PO Box 365067 San Juan, Puerto Rico 00936-5067.

La investigación descrita en este trabajo recibió ayuda económica de los donativos de NIH, EY08809 (SG-C) y RR03051 (Programa RCMI del Recinto de Ciencias Médicas).

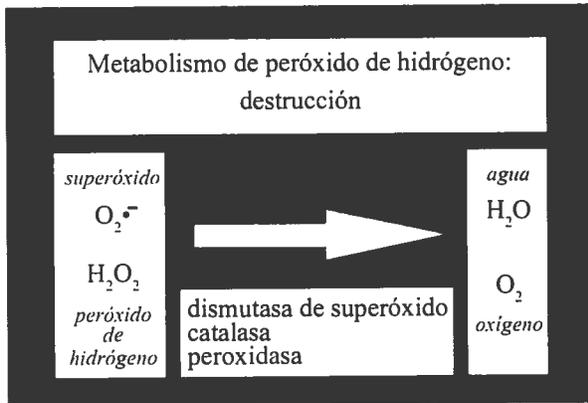
Conferencia presentada por invitación ante la 29ª Convención de la Sociedad Puertorriqueña de Oftalmología, Octubre 10-13 1997, Cerromar Beach Hotel, Dorado, Puerto Rico.



**Figura 1.** Metabolismo de peróxido de hidrógeno: producción

que puede producir peróxido de hidrógeno por dismutación enzimática. Algo del peróxido producido intracelularmente, y que ha escapado destrucción inmediata por catalasas y peroxidasas, llega a los líquidos extracelulares donde formas solubles de todos estos enzimas lo mantienen a niveles muy bajos, en el rango nM.

A veces podrían reaccionar peróxido de hidrógeno y superóxido (la denominada reacción de Haber-Weiss) para

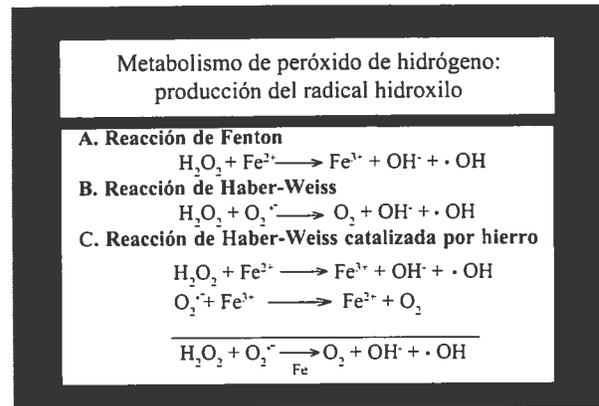


**Figura 2.** Metabolismo de peróxido de hidrógeno: destrucción

formar radicales hidroxilo, los más dañinos y reactivos de los radicales libres de oxígeno, que pueden atacar indiscriminadamente a cualquier molécula en su inmediato alrededor (Fig. 3B). Existe otra circunstancia especial en que  $H_2O_2$  puede convertirse en fuente del radical hidroxilo. Esto es en presencia de metales en su forma reducida. En tales casos se produce la llamada reacción de Fenton que lleva a la aparición del peligroso radical hidroxilo (Fig. 3A). Finalmente, la reacción de Haber Weiss puede ser catalizada por sales de hierro y cobre (Fig. 3A). Para evitar estas reacciones, hierro y cobre nunca están libres, sino asociados a proteínas fijadoras muy efectivas tanto intra-

como extracelulares: ceruloplasmina, transferrina y ferritina; otras como albúmina; y quizá incluso a compuestos de peso molecular mucho más bajo (3).

En cualquier tejido o fluido fisiológico, el nivel de equilibrio dinámico (*steady state*) de peróxido de



**Figura 3.** Metabolismo de peróxido de hidrógeno: producción del radical hidroxilo.

hidrógeno que puede detectarse en un momento dado depende de cómo compara su velocidad de producción con su velocidad de destrucción.

**$H_2O_2$  en el humor acuoso.** La composición del humor acuoso tiene gran relevancia para los tejidos del segmento anterior del ojo, por ser este el líquido extracelular que los baña. En 1991 las ideas prevalecientes en cuanto al peróxido de hidrógeno en el humor acuoso eran las siguientes:

(i) sus niveles, dependiendo de la especie animal, tienden a situarse entre 10 y 50  $\mu M$ , aunque se han descrito algunos valores fuera de estos límites (Tabla 1) (4-8). Se trata, pues, de concentraciones altas, en relación a las encontradas en otros líquidos extracelulares.

(ii) la fuente u origen de este  $H_2O_2$  podría ser la autooxidación de ascorbato (7), presente en el humor acuoso a concentraciones relativamente elevadas, sobretudo en las especies de hábitos diurnos (hasta 2 mM).

**Tabla 1.**  $H_2O_2$  en el Humor Acuoso: Método del DCPIP.

• Bovino	25 $\mu M$	(ref. 6)
• Cobayo	47 $\mu M$	(ref. 7)
• Conejo	59 $\mu M$	(ref. 4)
	61-89 $\mu M$	(ref. 5)
	33 $\mu M$ (cámara ant.)	(ref. 7)
	43 $\mu M$ (cámara post.)	(ref. 7)
	32 $\mu M$	(ref. 8)
• Rata	9 $\mu M$	(ref. 7)
• Rana	5 $\mu M$	(ref. 7)

(iii) en los pacientes de cataratas los niveles de  $H_2O_2$  están claramente aumentados, y en algunos casos el aumento es muy marcado (6).

(iv) se podrían prevenir las cataratas o evitar su progreso destruyendo el  $H_2O_2$  del humor acuoso.

El punto primero (i) lo habían establecido varios autores durante un período de casi 30 años. No deja de ser interesante que todos esos autores habían utilizado un mismo método de análisis, que llamaremos el método del diclorofenol indofenol (DCPIP). Este método fue aplicado originalmente al humor acuoso en 1965 (9), más bien como un método cualitativo de detección de peróxido de hidrógeno. Todos los autores que después lo usaron cuantitativamente podían reproducir poco más o menos los resultados que los otros habían encontrado previamente, con lo cual no había razón especial para cuestionar su confiabilidad.

El segundo punto (ii) se formuló basándose fundamentalmente en el hallazgo de una correlación entre las concentraciones de  $H_2O_2$  y ascorbato del humor acuoso usando el método del DCPIP (7). Se sabe que la oxidación de ascorbato produce peróxido de hidrógeno, si la misma ocurre en la presencia de sales metálicas. Dada la elevada concentración de ascorbato en el humor acuoso humano se asumió simplemente que debía existir cierto grado de autooxidación, aunque nunca se produjo una prueba directa definitiva, ni se consideró ulteriormente si el hierro en el humor acuoso estaba en efecto disponible para tal reacción.

El tercer punto (iii) fue establecido en 1981(6) usando de nuevo el mismo método que todos habían usado previamente para determinar la concentración de  $H_2O_2$  en el humor acuoso y cristalino tomados de pacientes durante la operación de cataratas (Tabla 2).

El cuarto punto (iv) fue la consecuencia directa de la línea de pensamiento de que existían niveles altos de  $H_2O_2$

**Tabla 2.**  $H_2O_2$  en el Humor Acuoso Humano: Cataratas (ref. 6)

• rango	10 a 660 $\mu M$ (*)
• promedio	82 (69) $\pm$ 155 $\mu M$
• "normal" (**)	24 $\pm$ 7 $\mu M$
• primates	27 $\pm$ 24 $\mu M$

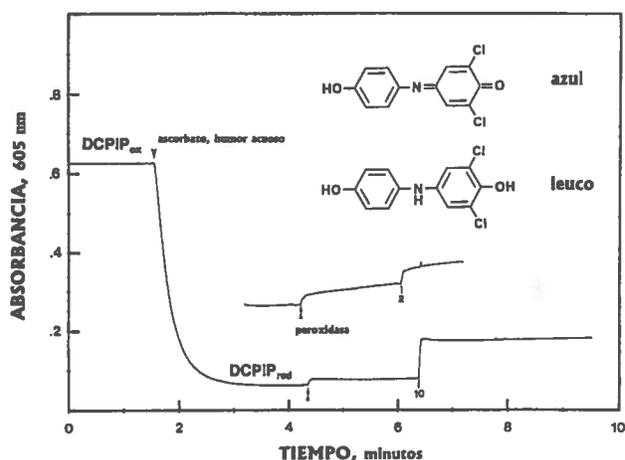
(\*) mM en un paciente de Marfan  
(\*\*) diabetes, glaucoma, retinoblastoma

en el humor acuoso normal y particularmente en el humor acuoso de personas con cataratas, y llevó a la búsqueda inmediata de peroxidasas artificiales (11).

Lo que era particularmente inquietante en estos hallazgos y conclusiones es que todas estaban basadas en el uso de un único método, el del DCPIP, cuando lo habitual en ciencia es verificar los resultados de varias maneras y con diferentes métodos y procedimientos para comprobar la

consistencia de los mismos. Existe, de hecho, en la literatura de aquel momento constancia del intento fallido de utilizar otros métodos (10) porque seguramente no permitían reproducir los resultados previamente publicados con el método del DCPIP.

**El método del diclorofenolindofenol (DCPIP).** En este método se emplea el fenol DCPIP como herramienta de medida. DCPIP puede estar en forma reducida ( $DCPIP_{red}$ ) u oxidada ( $DCPIP_{ox}$ ).  $DCPIP_{ox}$  tiene color azul (absorbe luz visible alrededor de 600 nm), pero al reducirse pierde el color. Cuando a una solución de  $DCPIP_{ox}$  se le echa humor acuoso (Fig. 4) se decolora (disminuye la absorción de DCPIP a 600 nm), por efecto del ascorbato presente en el humor acuoso, compuesto reductor que convierte  $DCPIP_{ox}$  a  $DCPIP_{red}$ . Dependiendo de la cuantía de la decoloración inducida se puede determinar, de hecho, la concentración de ascorbato en la muestra. A continuación se le añade una pequeña cantidad del enzima peroxidasa a la mezcla. Si había  $H_2O_2$  en el humor acuoso, el fenol se reoxida parcialmente, y sube la absorción de la mezcla



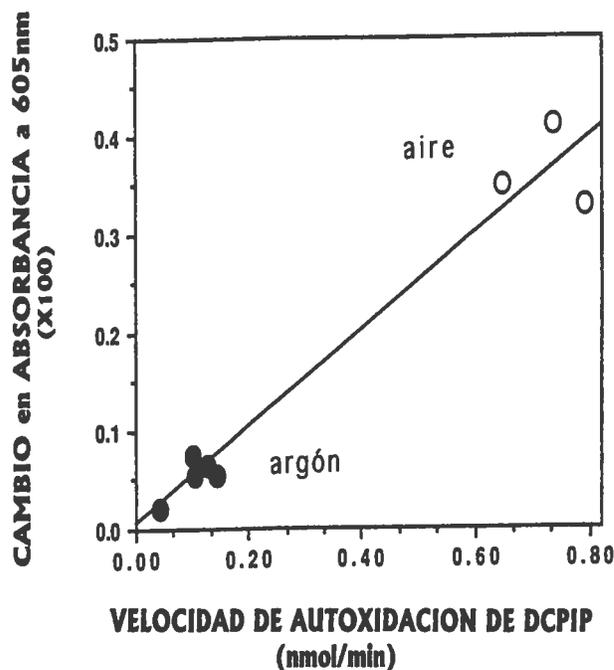
**Figura 4.** Cuantificación de ascorbato y  $H_2O_2$  con el método del diclorofenol indofenol (DCPIP). Al principio del registro se observa la absorbancia de  $DCPIP_{ox}$  a 605 nm justo por encima de las 0.6 unidades de absorbancia. Al añadir ascorbato (o humor acuoso) donde indica la flecha, poco antes de los 2 minutos del registro, la línea cae indicando que DCPIP se ha reducido ( $DCPIP_{red}$ ). La adición de peroxidasa (doble flecha) provoca un pequeño aumento de la absorbancia que es debida al  $H_2O_2$  acumulado por la autooxidación de  $DCPIP_{red}$  en los casi 3 minutos transcurridos tras la adición del ascorbato a la mezcla de reacción. Si estuviéramos analizando una muestra de humor acuoso este  $H_2O_2$  se añadiría a cualquier cantidad de  $H_2O_2$  que estuviese realmente presente en la muestra. La adición posterior de 10 nmoles de  $H_2O_2$  provoca una reoxidación cuantitativa de  $DCPIP_{red}$ , manifestada como una subida en la absorbancia del sistema. El trazo superior en la zona de 3 a 7 minutos representa a mayor ampliación la respuesta a la adición de 2 nmoles de  $H_2O_2$ . Obsérvese la tendencia de la línea base a subir poco a poco, reflejo de la mencionada autooxidación de  $DCPIP_{red}$ . Figura modificada de referencia (1).

en la región de 600 nm. Este incremento en absorción se toma como medida de la cantidad de  $H_2O_2$  que tenía la muestra. Se supone que si no hay  $H_2O_2$  en el sistema, como ocurre cuando no se le echa humor acuoso a la mezcla, sino solamente ascorbato, la adición de peroxidasa no aumenta la absorbancia de la mezcla. Sin embargo, esta premisa no se cumplía (6). El método es sencillo de ejecutar y es ingenioso, ya que en un mismo ensayo se determina tanto ascorbato como  $H_2O_2$ , de ahí probablemente su amplio uso. Al utilizar el método, sin embargo, pudimos comprobar la existencia de varios problemas importantes con el mismo, ninguno fácilmente corregible mediante las medidas habituales de correr simultáneamente blancos y controles.

Primer problema: el fenol reducido se reoxida lentamente en presencia de aire. Al estudiar el fenómeno, pudimos demostrar inequívocamente que durante esa autooxidación se producía  $H_2O_2$ , precisamente el compuesto que queríamos medir. Esto fue causa de gran alarma, porque a nadie se le ocurriría, de saberlo, medir un compuesto con un método que genera ese mismo compuesto. Al añadir la peroxidasa, el  $H_2O_2$  que se mide es el que supuestamente había en el humor acuoso, más el que se generó en el tiempo (uno o dos minutos como mínimo) que le toma al experimentador esperar a que, tras añadir el humor acuoso, se establezca la lectura a 600 nm de la muestra para enseguida añadir la peroxidasa. Es fácil calcular que en un minuto se producen concentraciones aparentes de  $H_2O_2$  del orden de las descritas como normales en el humor acuoso (1).

La reacción de autooxidación de los fenoles es bien conocida de los químicos orgánicos y solamente requiere oxígeno. No necesita catalizadores metálicos. Pero nadie había tomado precauciones de hacer la reacción en presencia de nitrógeno u otro gas inerte. Cuando hicimos esto, reduciendo el oxígeno a un mínimo, el supuesto o aparente peróxido del humor acuoso baja para dar valores entre 1 y 5  $\mu M$ , o sea, unas 10 veces más bajos de promedio que los valores reportados como normales. Y si pudiéramos llevar la mezcla de reacción a cero oxígeno, los resultados extrapolados darían una concentración cero de  $H_2O_2$  en el humor acuoso (Fig.5).

Segundo problema: la rapidez de autooxidación del fenol depende del nivel de  $DCPIP_{red}$  en la mezcla, que a su vez depende de la concentración de ascorbato que tenía el humor acuoso añadido, que es diferente de muestra a muestra y por tanto es una variable sobre la que no tenemos control. Esto es así por efecto de la conocida ley física de acción de masas. Cuanto más ascorbato tenga el humor acuoso, más  $DCPIP_{red}$  se forma en la mezcla de reacción, más rápida es la autooxidación del fenol y, por tanto, mayor será la concentración final aparente de peróxido



**Figura 5.** Determinación de  $H_2O_2$  en el humor acuoso del conejo. El análisis se hizo en presencia de aire (círculos vacíos) y en presencia de argón (círculos negros). El eje de las Y es equivalente a la concentración de  $H_2O_2$  en la muestra, que es aproximadamente 25  $\mu M$  de promedio en presencia de aire. Los valores en presencia de argón cubren concentraciones de 1 a 5  $\mu M$  de  $H_2O_2$ . El eje de las X representa la velocidad de autooxidación del  $DCPIP_{red}$ , que es un reflejo de la concentración de oxígeno bajo la que se hizo el análisis. Figura modificada de referencia (1).

en la muestra. Esto no sólo introduce gran incertidumbre en la concentración final calculada para peróxido, sino que crea una correlación directa puramente artificial entre las supuestas concentraciones de peróxido y las de ascorbato en el humor acuoso, como la descrita por Giblin y colaboradores en 1984 (7).

Tercer problema: puede demostrarse fácilmente que el humor acuoso inhibe la autooxidación del  $DCPIP_{red}$ , indicando que tiene componentes antioxidantes diferentes de ascorbato. Estos componentes podrían ser simplemente proteínas como albúmina y transferrina, ambas muy ricas en grupos -SH y la segunda capaz, en adición, de secuestrar hierro con gran afinidad. O también podría ser glutatión, que existe en el humor acuoso a bajas concentraciones. En cualquier caso, lo importante es que cuando se usa el método del  $DCPIP_{red}$  una misma cantidad de peróxido en la mezcla de reacción va a dar concentraciones aparentes diferentes dependiendo del poder antioxidante del humor acuoso.

Las conclusiones principales de nuestro trabajo fueron las siguientes:

A) En el humor acuoso normal no hay  $H_2O_2$  a niveles detectables con el método del DCPIP. Siendo el límite de detección de este método de aproximadamente  $0.3 \mu M$ , de haber  $H_2O_2$  debe ser por debajo de esa concentración. Esto nos acerca al nivel de  $H_2O_2$  que existe en otros líquidos extracelulares, al rango nM. Suponiendo que los niveles de  $H_2O_2$  fueran  $0.25 \mu M$ , justo bajo el límite de detección del método, tendríamos que los niveles reales de  $H_2O_2$  en el humor acuoso serían (al menos) 100 veces menores que los reportados. De acuerdo con esta conclusión pensamos que métodos que detecten  $H_2O_2$  a niveles mayores deben ser examinados con gran precaución.

B) El origen del  $H_2O_2$  del humor acuoso no es necesariamente ascorbato porque la correlación entre ascorbato y  $H_2O_2$  que se había observado usando el método del DCPIP puede explicarse fácilmente en base al diferente grado de autooxidación del fenol (que depende de la concentración de ascorbato en el humor acuoso), y no en base a la génesis de  $H_2O_2$  a partir de ascorbato. Por otro lado, el ascorbato en el humor acuoso debe ser considerablemente resistente a la oxidación dada la concentración baja de oxígeno, y la presencia de transferrina, de albúmina y de glutatión en ese líquido. De hecho, pudimos demostrar que el humor acuoso era en realidad capaz de inhibir la autooxidación de DCPIP.

C) Finalmente, nuestros hallazgos sugerían que podrían existir explicaciones alternas a los supuestos niveles tan altos de peróxido en las cataratas. No hay duda de que las lesiones celulares del proceso cataratogénico podrían causar deficiencias en la actividad de catalasas y peroxidases, amén de reducir la concentración de ascorbato y glutatión. La idea de niveles elevados de peróxido en cataratas es, pues, en cierto modo muy atractiva, si la pudiéramos sustentar inequívocamente. En nuestro trabajo, sin embargo, planteamos que no podemos descartar la posibilidad de un artefacto metodológico, derivado del uso del método del DCPIP. Tal artefacto se generaría del modo siguiente. Si el poder reductor del humor acuoso disminuye en las cataratas, la autooxidación del DCPIP durante el análisis sería mayor al analizar el humor acuoso de pacientes con cataratas que cuando se analiza el de individuos "normales". Lo cual se traduciría inmediatamente en niveles aparentes más altos de  $H_2O_2$  en el humor acuoso de personas con cataratas. No estamos seguros de cuál de estas dos alternativas es la realmente correcta. Lo que sí parece indudable es que si exagerados son los niveles de  $H_2O_2$  en el humor acuoso normal cuando se usa el método DCPIP, también deben ser exagerados los niveles reportados en cataratas usando el mismo método. Si estos se disminuyen en la proporción que se disminuyeron aquellos, unas 10 veces, tendríamos que

en cataratas los niveles de  $H_2O_2$  en el humor acuoso serían incluso más bajos de los que se han reportado como normales, o sea, algo menos de  $10 \mu M$ , de promedio. Esto sería tomando el estimado conservador de un factor reductor de  $\times 10$ . Si usamos un factor de  $\times 100$ , los niveles de  $H_2O_2$  en cataratas serían  $1 \mu M$ .

Aunque algunos autores dan la sensación de pensar lo contrario, la realidad es que las diferencias planteadas distan mucho de ser solamente académicas. Muchos autores considerarían que los tejidos oculares pueden tolerar una exposición a niveles de  $H_2O_2$  de  $20$  ó  $25 \mu M$  sin evidencia, al menos, de daño a corto plazo. Pero considerarían que niveles de  $100$  ó  $200 \mu M$  son claramente dañinos para el lente y el endotelio corneal. Así que si los niveles en cataratas se reducen en realidad a  $10 \mu M$ , o menos, posiblemente pierda mucho interés el intento de prevenir las cataratas destruyendo específicamente  $H_2O_2$  mediante el diseño de peroxidases artificiales, por ejemplo. Aunque siempre se puede argumentar que basta con que haya  $H_2O_2$ , no importa cuánto, para que eliminarlo sea beneficioso.

**Reacciones y críticas.** Nuestras conclusiones ponían en tela de juicio las creencias o hipótesis principales que existían en aquel momento sobre peróxido de hidrógeno en el humor acuoso, las cuales habían sido generadas, en realidad, por investigadores de gran prestigio en la comunidad científica. Debo aclarar inmediatamente que tales conclusiones no implicaban en modo alguno la proposición de que los fenómenos de oxidación fuesen irrelevantes a la aparición y progreso de las cataratas. A juzgar por toda la experiencia acumulada hasta la fecha, incluida la nuestra propia, se considera que los fenómenos de oxidación (de cualquier etiología) sí representan un mecanismo patogénico importante en las cataratas (11). Lo único cuestionado en nuestro trabajo era la especie de oxígeno responsable y la concentración real de  $H_2O_2$  tanto en el humor acuoso normal como en el de personas con cataratas.

¿En que hemos avanzado en estos 5 años? ¿Cuáles han sido las reacciones a nuestro trabajo? ¿Cuáles han sido las consecuencias de nuestro trabajo? Veamos algunos ejemplos representativos.

Aunque hay autores que han corroborado ampliamente las limitaciones del método DCPIP (12), hay otros que han preferido ignorar totalmente nuestros hallazgos y conclusiones (13-15). Por ejemplo, todavía se escribe en 1994 (13): "*These redox reactions of the dye [2,6-dichlorophenolindophenol] were utilized by Pirie to estimate  $H_2O_2$  in bovine aqueous humor. We observed that for the measurement of  $H_2O_2$  in eye tissues, this technique is suitable. It is especially useful for samples where ascorbic acid and  $H_2O_2$  are present together*".

En 1997 leemos (15): "*It is generally accepted that oxidative stress is an initiating or early event in the development of maturity onset cataract. And there is considerable evidence suggesting that  $H_2O_2$  is the primary oxidant involved. Hydrogen peroxide is elevated from 3 to more than 5 fold in a significant number of patients with cataract. At these concentrations,  $H_2O_2$  causes cataract in organ culture*".

En los ejemplos citados no se hace referencia alguna a nuestra publicación de 1992 (1), lo cual era casi obligado. Al menos se debería haber dado una buena razón para no tenerla en cuenta. Eso es lo que pensamos la ciencia exige de los científicos. Reflejo adicional de que no se le ha prestado la debida atención a esa publicación es que se siguen haciendo experimentos de estrés oxidativo con el cristalino, la córnea y células derivadas en cultivo, etc., en que se utilizan concentraciones artificiales de  $H_2O_2$  que llegan hasta 1000  $\mu M$ , o incluso son más altas, siendo en la mayoría de los casos de 100 o 200  $\mu M$ , basándose en que estas últimas son concentraciones habituales de peróxido en las cataratas. Desde nuestro punto de vista, es ciertamente muy dudoso el valor que tengan experimentos realizados bajo condiciones tan poco fisiológicas.

Se han presentado en foros de la especialidad algunos resultados que podrían constituir críticas veladas a los nuestros:

i) El DCPIP<sub>ox</sub> también se destruye por  $H_2O_2$ , hallazgo que fue publicado posteriormente (22). Esto tendería a subestimar peróxido, no a sobreestimar, como hemos argumentado nosotros. En otras palabras, las concentraciones de  $H_2O_2$  reportadas en la literatura, que nosotros consideramos artificialmente elevadas, en realidad serían subestimaciones de las verdaderas. Unos sencillos cálculos detallados en nuestro trabajo original (1) invalidan esta crítica, sin embargo: durante el ensayo, por cada molécula de  $H_2O_2$  que se procesa deben producirse dos DCPIP<sub>ox</sub> en presencia de peroxidasa. Y eso fue lo que esencialmente se obtuvo. Por lo tanto, no estamos subestimando peróxido de manera significativa. Además, la observación de que  $H_2O_2$  destruye a DCPIP<sub>ox</sub> en presencia de peroxidasa está basada en condiciones de reacción en las que la proporción de  $H_2O_2$  a DCPIP<sub>ox</sub> son mucho mayores de lo habitual, lo cual favorece obviamente la oxidación de DCPIP<sub>ox</sub> (22).

ii) El humor acuoso añadido a una solución de  $H_2O_2$  induce la desaparición del peróxido. El hallazgo se ha interpretado arbitrariamente en el sentido de afirmar que  $H_2O_2$  desaparece muy rápido del humor acuoso cuando éste se extrae del ojo. Así que cuando nosotros hacemos los análisis ya se ha escapado. En otras palabras, los niveles de  $H_2O_2$  *in vivo* podrían ser mucho mayores de

los actualmente detectados. Sin embargo, la explicación probablemente más plausible de este resultado (a falta de detalles experimentales explícitos) puede tener que ver más bien con el empleo de reactivos y soluciones no exentos de trazas de metales, o con una dilución excesiva final del humor acuoso, que alteren sus propiedades redox originales. Es irónico que el argumento se aplique solamente a nuestro trabajo, porque nosotros sí que teníamos muy buenas razones para ejecutar lo más rápido posible los análisis, de modo que, de ser cierta la hipótesis mencionada, deberíamos haber obtenido los valores más altos de peróxido en el humor acuoso de todos los autores. De hecho, aunque no incluido en el trabajo original, llegamos a hacer análisis en anaerobiosis prácticamente simultáneos a la toma de la muestra. En ningún caso los valores de  $H_2O_2$  así obtenidos fueron mayores que si el tubito con la muestra de humor acuoso esperaba en hielo sellado por 10 ó 20 minutos.

**Nuevos métodos de determinación de  $H_2O_2$ .** No hay duda de que nuestros hallazgos sí han servido por lo menos de estímulo explícito o tácito para la búsqueda de nuevos métodos de determinación de  $H_2O_2$  en el humor acuoso. En realidad, hay numerosos métodos de determinar  $H_2O_2$  disponibles para ser aplicados a sistemas biológicos (16-20). Lo importante es seleccionar alguno que pueda aplicarse con confianza al humor acuoso y que sea suficientemente sensitivo para no tener que usarlo en sus límites de detección. Es decir, si se esperan valores experimentales en el rango  $\mu M$  bajo, el límite de detección del método no debe estar en ese mismo rango, sino en el rango nM. Para validar tal método debe poder demostrarse, entre otras cosas, que: (a) es específico para peróxido de hidrógeno; (b) componentes conocidos o desconocidos del humor acuoso no interfieren; (c) es posible la recuperación cuantitativa de  $H_2O_2$  añadido exógenamente.

En nuestra opinión, un método ideal para la determinación de  $H_2O_2$  debería incluir la separación previa de  $H_2O_2$  de otros componentes del humor acuoso mediante cromatografía de eficiencia elevada (HPLC), seguida de su detección post-cromatográfica con alguno de los numerosos métodos disponibles. Esto eliminaría de raíz casi todos los problemas que los métodos actuales presentan.

En 1991, estando ya la publicación de nuestro trabajo en proceso, otros autores (21) publicaban una confirmación de los resultados obtenidos con el método del DCPIP (Tabla 3) utilizando un método radiactivo de determinación de peróxido de hidrógeno en el humor acuoso, inicialmente diseñado por uno de los propios autores en 1989. Este método está basado en la descarboxilación de  $\alpha$ -cetoglutarato inducida por  $H_2O_2$ .

Aunque por la razón mencionada no pudimos hacer referencia en aquel momento al mismo, los principales argumentos que sugieren que el método radiactivo puede ser problemático son los siguientes: (a) se obtienen valores muy altos de peróxido en líquidos como orina, plasma, o tejidos como el cristalino, de los que no hay confirmación ulterior por otros autores, o en los que otros autores encuentran valores mucho más bajos. Más importante aún, confirmar valores de concentración de  $H_2O_2$  en el humor acuoso obtenidos con el método del DCPIP, cuando nosotros comprobamos las serias limitaciones de este método, según usado habitualmente, no constituye exactamente la mejor garantía de que el nuevo método es confiable; (b) el método podría carecer de la especificidad necesaria, ya que otros peróxidos interfieren y existe la posibilidad de decarboxilación del sustrato no dependiente de peróxido. Por otro lado, las muestras de humor acuoso podrían tener sustratos similares que de algún modo interferirían con el sustrato usado para el ensayo.

Estos autores reportan posteriormente otro método (22) basado en la inducción de quimioluminiscencia de luminol por  $H_2O_2$ , y obtienen valores en el cristalino de rata comparables a las dadas por el método radioactivo. Nos remitimos sobretudo al comentario acabado de hacer en (a): métodos que reproduzcan los hallazgos obtenidos con el método del DCPIP, tal y como se usaba habitualmente en presencia de oxígeno, deben ser mirados con gran precaución. Desde el punto de vista de proveer ese punto de referencia sí consideramos verdaderamente útil al método del DCPIP. Además, un método quimioluminescente similar (23) fue estudiado por nosotros poco después de experimentar con el método del DCPIP. Se trata sin duda de un método muy sensitivo pero altamente susceptible a interferencias. Tras reducir éstas al mínimo, los valores estimados de peróxido en el humor acuoso de conejo pasaban al nivel nM, consistentes con nuestro trabajo previo. Los resultados aún no se han sometido a publicación, esperando precisamente confirmación con algún otro procedimiento de mayor garantía.

**ARVO 1997.** En la última reunión anual de ARVO (1997) se ha presentado quizá el más ambicioso intento

de resolver la controversia, con el trabajo hecho en el laboratorio de David Beebe (24). El intento podría resultar conservador, sin embargo, por las razones que exponemos más abajo. Estos autores se hicieron eco de nuestro planteamiento y corroboran los hallazgos con el método del DCPIP. Tras explorar alternativas, reportan resultados con un método electroquímico de análisis de  $H_2O_2$  realizado con un instrumento de la compañía *Yellow Springs Instrument (YSI)*, basado en la oxidación de  $H_2O_2$  a  $O_2$  sobre un electrodo de platino (25). Estudian pacientes con cataratas, afáquicos y con patologías que respetaban el segmento anterior. Aunque no reportan valores normales en animales llegan a la conclusión de que, en efecto, los valores de peróxido de hidrógeno en pacientes de cataratas son notablemente más bajos de lo descrito en la literatura usando el método de DCPIP, incluso más bajos aún que los reportados hasta la fecha como normales; que el peróxido detectable no procede del cristalino; y concluyen afirmando que el papel de  $H_2O_2$  en formación de cataratas podría ser menor de lo previamente supuesto.

Aunque la comunicación original publicada fue elaborada a base de 25 pacientes, en la presentación oral de ARVO reportaron resultados obtenidos en 65 pacientes, y proveyeron datos adicionales a los previamente impresos. En el 50% de los casos de cataratas encontraron valores de  $H_2O_2$  menores de  $20 \mu M$ ; no encuentran  $H_2O_2$ , o solamente trazas, en 25% de los casos; y encuentran valores mayores de  $30 \mu M$  solamente en 25% de los casos. Más que con cataratas los valores altos los relacionan con casos de franca inflamación ocular o con casos sometidos a cursos terapéuticos intensos.

Nosotros pensamos que aún los valores reportados por estos autores podrían representar sobrestimaciones analíticas. Esto es porque el procedimiento, al ser un método electroquímico, no asegura especificidad. La única especificidad del sistema parece ser dependiente del tamaño de las moléculas que pueden llegar al electrodo a través de una membrana porosa, según la literatura obtenida de YSI. Las interferencias son, pues, posibles. Aunque desconocemos los detalles, el relativamente alto voltaje que probablemente es necesario aplicar a la muestra para oxidar  $H_2O_2$  podría oxidar, de llegar al electrodo, muchos otros componentes. Por otro lado, los propios autores mencionaron que el método no es útil por debajo de  $5 \mu M H_2O_2$  (YSI nos informa un límite de detección de  $3 \mu M$ ) y tiene un ruido de fondo (*background*) de  $8 \mu M$  cuando se usa con humor acuoso. Este ruido parece que no ha sido abstraído de los valores reportados de  $H_2O_2$ , lo que disminuiría aún más los ya rebajados niveles de  $H_2O_2$  en el humor acuoso y arroja incertidumbre adicional al sistema en ese rango de concentración. El método, desde luego, no sería aplicable

**Tabla 3.** Niveles de peróxido de hidrógeno en el humor acuoso: método radioisotópico (ref. 21)

• bovino	35 $\mu M$	• baboon	5 $\mu M$
• ovino	17 $\mu M$	• cobayo	30 $\mu M$
• pollo	7 $\mu M$	• conejo	41 $\mu M$
• rana	16 $\mu M$	• perro	9 $\mu M$
• gato	5 $\mu M$	• rata	7 $\mu M$
• humano (cataratas)	189±88 $\mu M$ (33-324 $\mu M$ )		

para determinar los niveles normales de peróxido de hidrógeno en el humor acuoso.

### Conclusión

De comprobarse finalmente que los valores de  $H_2O_2$  son mucho más bajos en cataratas de lo supuesto, es posible que se haya inclinado la balanza hacia nuevas estrategias de medicamentos preventivos para cataratas, en el sentido de prestar más atención a antioxidantes de "amplio espectro" y no a los dirigidos solamente contra peróxido. No hay que olvidar, sin embargo, que queda la posibilidad de que existan circunstancias patológicas favorables para que se produzcan reacciones intraoculares tipo Fenton/Haber-Weiss, en cuyo caso cualquier nivel de peróxido en el humor acuoso se convierte en un arma muy ofensiva para los tejidos adyacentes. Identificar posibilidades de esta naturaleza constituye un área de investigación que debería recibir atención preferente.

Los estudios clínicos (*clinical trials*) en proceso dirigidos a probar el efecto de antioxidantes en el envejecimiento o en otras patologías crónicas podrían ser reveladores, aunque no hayan sido específicamente dirigidos al problema de las cataratas, si en tales estudios se ha incluido una adecuada colección de datos visuales, por mínima que sea. En tal caso, puede que tengamos el beneficio marginal de algunas respuestas definitivas sobre prevención de cataratas antes de que conozcamos el mecanismo exacto del daño.

Si hubiéramos de dar una impresión general como resumen, podríamos decir que ha habido una gran inercia a cambiar ideas arraigadas por años en la literatura científica, a pesar de haber presentado datos muy sólidos al respecto. Esto nos sugiere que la ciencia, o el establecimiento científico, como cualquier otra parcela del quehacer humano, puede ser de insospechada complejidad en sus consideraciones. Desde el punto de vista práctico sigue siendo urgentemente necesario diseñar un método específico, sensitivo y confiable de determinación de peróxido de hidrógeno en el humor acuoso. Siento la responsabilidad de que debemos ser nosotros quienes aclaremos definitivamente el problema, por haber creado la controversia.

### Abstract

Ideas prevailing in 1991 on hydrogen peroxide in the aqueous humor are outlined. They are critically examined under the light of our finding that the method used to establish aqueous humor levels of peroxide generates itself peroxide during the short time span of the analysis. This is due to the fact that the probe used, dichlorophenol

indophenol (DCPIP), spontaneously autooxidizes in the presence of oxygen. It was concluded then that the level of hydrogen peroxide in the aqueous humor cannot be higher than about 0.3  $\mu$ M, the detection limit of the DCPIP method. It was also concluded that the statement commonly made in the literature that aqueous humor hydrogen peroxide derives from the oxidation of ascorbate, an abundant component of that fluid, is based solely on the use of the DCPIP method, and so could easily be due to a methodological artifact. The same applies to the statement that the levels of hydrogen peroxide are very high in human senile cataracts. The surprising resistance to accept the results and conclusions of our 1992 publication is documented. Finally, the content is discussed of an oral presentation made at the 1997 ARVO Annual Meeting in which an important portion of our results and conclusions was confirmed, perhaps signaling a shift towards a wider acceptance of our findings.

### Referencias

1. García-Castiñeiras S, Velázquez S, Martínez P, Torres N. Aqueous humor hydrogen peroxide analysis with dichlorophenol-indophenol. *Exp Eye Res* 1992;55:9-19.
2. Halliwell B, Gutteridge JMC. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol* 1990;186:1-85.
3. Gutteridge JMC, Halliwell B. The antioxidant proteins of extracellular fluids. In: Chou CK, ed. *Cellular antioxidant defense mechanisms*, vol II. Florida, CRC Press 1988;1-23.
4. Bhuyan KC, Bhuyan DK. Regulation of hydrogen peroxide in eye humors. Effect of 3-amino-1H-1,2,4-triazole on catalase and glutathione peroxidase of rabbit eye. *Biochim Biophys Acta* 1977;497:641-51.
5. Matsuda H, Giblin FJ, Reddy VN. The effect of X-irradiation on cation transport in rabbit lens. *Exp Eye Res* 1981;33:253-65.
6. Spector A, Garner WH. Hydrogen peroxide and human cataract. *Exp Eye Res* 1981;33:673-81.
7. Giblin FJ, McCreedy JP, Kodama T, Reddy VN. A direct correlation between the levels of ascorbic acid and  $H_2O_2$  in aqueous humor. *Exp Eye Res* 1984;38:87-93.
8. Csukas SC, Costarides A, Riley MV, Green K. Hydrogen peroxide in the rabbit anterior chamber: effects of glutathione, and catalase effects on peroxide kinetics. *Curr Eye Res* 1987;6:1395-402.
9. Pirie A. Glutathione peroxidase in lens and a source of hydrogen peroxide in aqueous humour. *Biochem J* 1965;96:244-53.
10. Riley MV, Schwartz CA, Peters MI. Interactions of ascorbate and  $H_2O_2$ : implications for in vitro studies of lens and cornea. *Curr Eye Res* 1986;5:207-16.
11. Spector A. The lens and oxidative stress. In: Sies H, ed. *Oxidative stress: oxidants and antioxidants*. New York: Academic Press; 1991. p.529-558.
12. Giasson C, Brunette I, Bleau G, Filion B. Oxidative status in the rabbit aqueous humor after excimer laser photorefractive keratectomy (PRK). *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997;38:S284.
13. Bhuyan DK, Bhuyan KC. Assessment of oxidative stress to eye in animal model for cataract. *Methods Enzymol* 1994;233:630-9.
14. Tumminia SJ, Chambers C, Qin C, Zigler JS (Jr), Russell P. A comparison of antioxidant enzyme activities in organ-cultured

- Rhesus monkey lenses following peroxide challenge. *Curr Eye Res* 1996;15:845-51.
15. Spector A, Ma W, Wang R-R, Yang Y and Ho Y-S. The contribution of GSH peroxidase-I, catalase and GSH to the degradation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by the mouse lens. *Exp Eye Res* 1997;64:477-85.
  16. Hildebrandt AG, Roots I, Tjoe M, Heinemeyer G. Hydrogen peroxide in hepatic microsomes. *Methods Enzymol.* 1978;52:342-50.
  17. Green MJ, Hill HAO. Chemistry of dioxygen. *Methods Enzymol* 1984;105:3-22.
  18. Baggiolini M, Ruch W, Cooper PH. Measurement of hydrogen peroxide production by phagocytes using homovanillic acid and horseradish peroxidase. *Methods Enzymol* 1986;132:395-400.
  19. Test ST, Weiss SJ. Assay of the extracellular hydrogen peroxide pool generated by phagocytes. *Methods Enzymol* 1986;132:401-6.
  20. Pick E. Microassays for superoxide and hydrogen peroxide production and nitroblue tetrazolium reduction using and enzyme immunoassay microplate reader. *Methods Enzymol* 1986;132:407-21.
  21. Ramachandran S, Morris SM, Devamanoharan P, Henein M, Varma SD. Radio-isotopic determination of hydrogen peroxide in aqueous humor and urine. *Exp Eye Res* 1991;53:503-6.
  22. Devamanoharan PS, Varma SD. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Determination in rat lens: chemiluminescent versus radioisotopic methods. *Ophthalmic Res* 1995;27(suppl 1):39-43.
  23. Seitz WR. Chemiluminescence detection of enzymically generated peroxide. *Methods Enzymol* 1978; 57:445-62
  24. Sharma Y, Druger R, Mataic D, Bassnett S, Beebe DC. Aqueous humor hydrogen peroxide and cataract. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997;38(Abstract Book, part II):S1149.
  25. Yellow Springs Instrument Co., Inc. Application Note number 317: Determination of hydrogen peroxide. Yellow Springs, Ohio.

## Nota Editorial

**E**ste artículo no posee el formato habitual de un trabajo de investigación. Sin embargo, sí está basado en un sólido trabajo de investigación original del autor. En él se avanzan opiniones y se establece la posición de el autor ante una controversia importante creada con su publicación previa en *Experimental Eye Research* 1992;55:9-19. El trabajo sometido relata la reacción de la comunidad científica a un planteamiento controversial dentro de un período específico y limitado de tiempo.