

CONCENTRACIONES DE COLESTEROL, α -TOCOFEROL Y RETINOIDES EN ACEITE DE SILICONA TRAS SU UTILIZACIÓN COMO SUSTITUTIVO VÍTREO

CHOLESTEROL, α -TOCOPHEROL, AND RETINOID CONCENTRATIONS IN SILICONE OIL USED AS A VITREOUS SUBSTITUTE

PASTOR JC¹, DEL NOZAL MJ², MARINERO P³, DÍEZ O⁴

RESUMEN

Objetivo: Determinar si existen concentraciones de compuestos lipofílicos de origen orgánico en muestras de aceite de silicona extraídas de ojos humanos y comprobar si existe alguna relación con el tiempo de permanencia intraocular del aceite.

Métodos: Por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se han determinado las concentraciones de ácido retinoico, retinol, retinal, colesterol y α -tocoferol en 23 muestras de aceite de silicona de 1.000 cs, extraídas de pacientes con desprendimientos complejos de retina con tiempos de permanencia intraocular variables (3 a 50 meses).

Resultados: Se han encontrado concentraciones de todos los compuestos, sobre todo de colesterol, y en menor medida de α -tocoferol. Se ha observado una correlación inversa de la edad y las concentraciones de ácido retinoico ($p=0,023$). Y una correlación

ABSTRACT

Objective: To verify the existence of organic lipophylic compounds in silicone oil extracted from human eyes following its use for previous retinal detachment, and to determine the intraocular permanence time of these substances in the oil.

Methods: Concentrations of retinoic acid, retinol, retinal, cholesterol and α -tocopherol were detected by HPLC in 23 samples of silicone oil extracted from patients with complicated retinal detachments. The time interval between the time of injection of the silicone oil and the subsequent assessment varied from 3 to 50 months (the permanence time).

Results: All tested compounds were found in the samples, but these were most commonly cholesterol and less frequently α -tocopherol. There was an inverse relationship between retinoic acid concentration and age ($p=0.023$), and a direct relationship

Recibido: 22/6/05. Aceptado: 16/1/06.

¹ Doctor en Medicina. Instituto Universitario de Oftalmobiología Aplicada (IOBA), grupo de Retina. Universidad de Valladolid. Servicio de Oftalmología. Hospital Clínico Universitario de Valladolid.

² Doctor en Química. Departamento de Química Analítica. Universidad de Valladolid.

³ Licenciada en Química. Instituto Universitario de Oftalmobiología Aplicada (IOBA), grupo de Retina. Universidad de Valladolid. Departamento de Química Analítica. Universidad de Valladolid.

⁴ Licenciada en Estadística. Instituto Universitario de Oftalmobiología Aplicada (IOBA), grupo de Retina. Universidad de Valladolid.

Este trabajo ha sido realizado en parte con una ayuda de investigación de la Junta de Castilla y León (VA81/96) y un proyecto subvencionado por el FIS (PI02081).

Correspondencia:

J. Carlos Pastor Jimeno

Instituto Universitario de Oftalmobiología Aplicada (IOBA). Edificio de Ciencias de la Salud

Avda. Ramón y Cajal, 7

47005 Valladolid

España

E-mail: pastor@ioba.med.uva.es

directa entre el tiempo de permanencia intraocular del aceite y los niveles de colesterol ($p=0,0008$) que se mantiene hasta los 20 meses.

Conclusiones: Se confirma que el aceite de silicona no es una sustancia tan inerte ya que es capaz de disolver compuestos lipídicos procedentes de tejidos intraoculares. Existe una elevación lineal de los niveles de colesterol que podría utilizarse como orientación para decidir cuándo extraer el aceite de silicona, aunque hacen falta estudios con series más grandes.

Palabras clave: Retinal, retinol, ácido retinoico, colesterol, α -tocoferol, aceite de silicona, sustitutivo vítreo.

between cholesterol concentration and permanence time ($p=0.0008$) at least up to 20 months.

Conclusions: These findings confirm that silicone oil is not an inert substance but is capable of extracting lipophylic compounds from the intraocular tissues. There is a clear linear elevation of cholesterol levels with increased intraocular permanence time. This finding could be used to further establish a safe permanence time for intraocular silicone oil used in ophthalmologic surgery. More studies with larger samples are warranted to evaluate this further (*Arch Soc Esp Oftalmol* 2006; 81: 13-20).

Key words: Retinal, retinol, retinoic acid, cholesterol, α -tocopherol, silicone oil, vitreous substitute.

INTRODUCCIÓN

El aceite de silicona (SiO), es un término utilizado para designar a cualquiera de los compuestos poliméricos hidrofóbicos basados en la química del siloxano que se emplean como sustitutivos vítreos desde la década de los años 60 (1).

Aunque se han considerado sustancias relativamente inertes se han publicado, a lo largo de estos años, numerosos efectos adversos, con sus correspondientes correlatos histopatológicos (2). Existen sin embargo trabajos que niegan esta toxicidad, o que la atribuyen a circunstancias no directamente relacionadas con el uso del SiO. En cualquier caso, no está siendo fácil encontrar alternativas para este sustitutivo vítreo de larga duración y en estos momentos se sigue considerando al SiO como la mejor opción para la reparación de desprendimientos de retina muy complejos.

Para mejorar su biocompatibilidad se utilizan aceites muy purificados, intentando reducir al máximo la presencia de los denominados compuestos de bajo peso molecular (Low Molecular Weight Components: LMWCs) (3-6).

Pero a pesar de que hoy se utilizan SiO con el más alto grado de pureza posible siguen existiendo complicaciones cuya patogenia sigue sin ser bien comprendida tales como la queratopatía en banda, la hipotonía crónica o el desarrollo de inflamación intraocular (2).

Algunos autores las han atribuido a efectos puramente mecánicos del aceite (7) lo que en ocasiones no es fácil de admitir a partir de los hallazgos anatómicos encontrados en ojos humanos (6).

Un aspecto que no ha merecido excesiva atención por parte de los investigadores, es la naturaleza lipofílica de estos compuestos, de tal manera que pueden causar daño, porque son capaces de disolver los lípidos intraoculares. Teóricamente, y en función de sus parámetros de solubilización no se disolverían en el SiO los fosfolípidos ni las proteínas, pero sí lo harían el colesterol y sus esteroides, así como las vitaminas liposolubles como la vitamina A. Esta posible capacidad patogénica, fue explorada por Miguel F. Refojo en 1988 (8) en estudios experimentales con conejos y analizando las concentraciones de lípidos en muestras de SiO que habían permanecido en dos ojos humanos durante 51 y 96 semanas respectivamente. Sus resultados mostraron la presencia de cantidades mensurables de colesterol y retinol, en los aceites (silicona y fluorsilicona), lo que se interpretó como una prueba de que estas sustancias no son tan inertes como se creía. El mismo autor realizó experimentos similares, con un copolímero de silicona-fluorsilicona, denominado SiFo (9,10) encontrando también la presencia de retinol y colesterol.

El propósito de este trabajo ha sido el analizar las concentraciones de colesterol, α -tocoferol y retinoides (ácido retinoico, retinol, retinal) en muestras obtenidas de pacientes en los que fue necesario utilizar SiO intraocular que fue extraído tras un cierto tiempo de permanencia intraocular, tras suponer el cirujano que el tiempo había sido el adecuado. Y así mismo intentar establecer las posibles correlaciones de dichas concentraciones con el tiempo que se mantuvieron dentro del ojo.

SUJETOS, MATERIAL Y MÉTODOS

Tras obtener la aprobación del Comité de Investigación de nuestro centro (Hospital Clínico Universitario de Valladolid), se extrajeron 23 muestras de SiO altamente purificado de 1.000 cs de pacientes en los que fue necesario utilizar esta sustancia para reparar desprendimientos de retina complejos, fundamentalmente complicados con vitreorretinopatía proliferante (VRP). Los procedimientos se realizaron conforme a la Declaración de Helsinki en su versión de 1983.

Las características de la muestra aparecen en la tabla I.

Métodos analíticos

El SiO se extrajo del ojo del paciente con una jeringa de aspiración de vidrio, se depositó en un frasco del mismo material que fue sellado con un tapón de teflón y envuelto con papel de aluminio y se remitió al Departamento de Química Analítica, sin ninguna otra manipulación. Las muestras permanecieron en nevera y aislados de la luz hasta las determinaciones.

Tabla I. Características de los pacientes de la muestra y tiempo de permanencia intraocular del aceite de silicona

Muestra	Edad	Sexo	Tiempo permanencia (meses)
1	66	V	2,0
2	58	V	3,0
3	25	V	4,0
4	23	Y	5,4
5	50	V	5,8
6	61	V	7,2
7	45	H	7,4
8	30	V	11,5
9	64	V	11,7
10	54	V	12,5
11	45	V	13,0
12	59	H	13,1
13	67	V	13,3
14	14	H	13,5
15	47	V	15,0
16	40	H	15,0
17	16	V	15,7
18	41	V	17,5
19	28	H	17,9
20	70	H	19,6
21	59	V	19,8
22	14	H	20,2
23	56	V	47,9

Para la determinación simultánea de ácido retinoico, retinol, retinal, colesterol y α -tocoferol se empleó la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Hewlett-Packard HP-1050, Waldbronn, Germany).

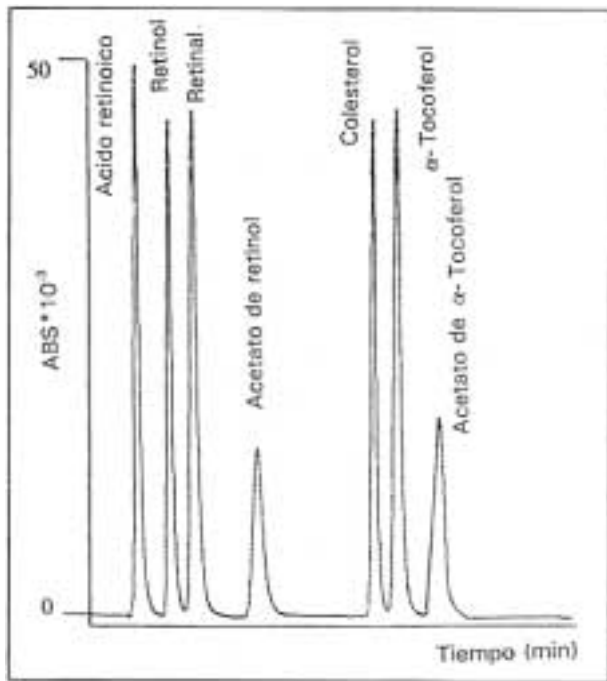
Para la separación se utilizó una columna C₈ Zorbax (Jones Chromatography, Lakewood, Colorado, USA) (15 x 0,46 cm) de 5 mm de diámetro de partícula. Para llevar a cabo el análisis simultáneo de los cinco compuestos con sus respectivos patrones internos, se realizó un cambio de fase móvil. Se utilizó acetonitrilo: acetato amónico 0,2 M (75:25, v/v) a un flujo de 2 ml min⁻¹ durante 10 minutos para a continuación, mediante un gradiente lineal de 1 minuto, pasar una mezcla de metanol: agua (95:5, v/v) a un flujo de 1,5 ml min⁻¹ hasta el final de la separación. Para aumentar la sensibilidad de la determinación se realizó también un cambio en la longitud de onda de detección, realizándose a 350 nm durante los 14 primeros minutos y luego hasta el final del análisis a 210 nm.

En la figura 1 se muestra el cromatograma correspondiente a la inyección de 20 ml de una mezcla de patrones en las condiciones anteriormente citadas y en la figura 2 el correspondiente a una muestra de un paciente (el número 13 de la serie). Los tiempos de retención resultaron ser muy reproducibles, estando los coeficientes de variación comprendidos entre el 0,25% para el α -tocoferol y 2,16% para el ácido retinoico.

Preparación de las muestras

Como paso previo a la extracción se realizó la eliminación total del agua con cloruro de metileno (2 ml por gramo de silicona). A continuación, se añadió sulfato sódico anhidro para completar la eliminación. Posteriormente se pasó por filtros de 0,45 mm para eliminar el sulfato sódico, y sobre el líquido, llevado a 50°C, se burbujeó helio hasta la eliminación completa del disolvente.

Para aislar los compuestos de interés de la matriz de aceite de silicona se empleó la extracción en fase sólida con cartuchos de sílice (Si-Bond Elut, Varian) con 1 g de relleno. A 1 g de muestra seca se le añadieron 25 μ l de acetato de retinol y de acetato de tocoferol, utilizados como patrones internos para la cuantificación, de concentración 0,1 mg ml⁻¹, 25 μ l de BHT de 1 mg ml⁻¹, como antioxidante, y 1 ml de n-hexano. A continuación, la solución resultante, se



tr (Ácido Retinoico):	2,26 min
tr (Retinol):	4,40 min
tr (Retinal):	5,93 min
tr (Acetato de retinol):	9,85 min
tr (Colesterol):	17,03 min
tr (α-Tocoferol):	18,24 min
tr (Acetato de α-Tocoferol):	21,38 min

Fig. 1: Cromatograma correspondiente a la inyección de una mezcla de patrones.

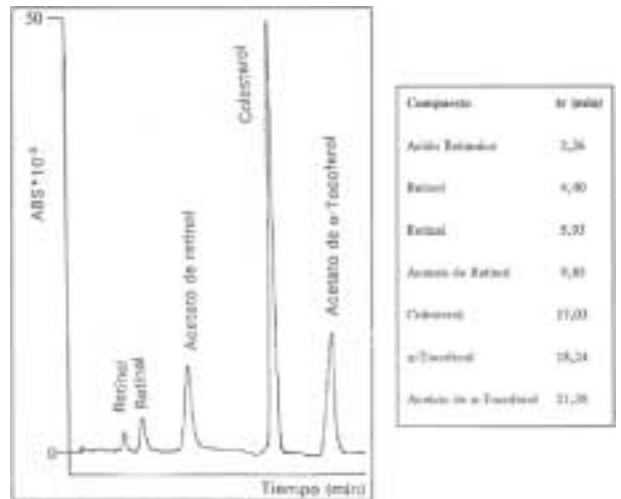


Fig. 2: Cromatograma correspondiente a la inyección de una muestra extraída del ojo de un paciente (muestra 13).

España). El cloruro de metileno fue suministrado por Merck (Darmstadt, Alemania). El acetato amónico, acetato sódico, fosfato amónico monobásico, sulfato sódico anhidro fueron de grado analítico y proporcionados por Merck (Darmstadt, Alemania).

El ácido retinoico, retinol, retinal, α-tocoferol, colesterol, acetato de retinol, acetato de α-tocoferol, utilizados como patrón interno y el butilhidroxitolueno (BHT) se adquirieron en Sigma-Aldrich (Madrid, España). El BHT se empleó como antioxidante estableciéndose con experimentos específicos que el empleo de 50 ppm de este compuesto permitiría conservar los patrones con un error inferior al 3%, durante un período de 60 días.

Calibración

Se prepararon disoluciones individuales de cada uno de los compuestos en n-hexano y a partir de ellas se preparó una mezcla patrón de concentración conocida en cada uno de los compuestos de interés.

Para la cuantificación de los compuestos se utilizó el método del patrón interno. La calibración de los compuestos se realizó añadiendo diferentes volúmenes de la mezcla de patrones a 1 g de sílica purificada sometiéndolas al mismo tratamiento que las muestras a analizar. Las curvas de calibrado se obtuvieron por repetidas inyecciones de un volumen fijo de 20 µl en un rango de concentraciones de

hizo pasar por el cartucho previamente activado con el paso de 5 ml de n-hexano y se realizó la elución de los compuestos con 0,5 ml de metanol, se filtró y se procedió a su inyección en el cromatógrafo.

El tratamiento descrito proporcionaba elevadas recuperaciones, superiores al 93% para todos los compuestos y buena reproducibilidad.

Reactivos

Todos los disolventes utilizados fueron de calidad HPLC. El acetonitrilo, metanol, n-hexano y n-propanol fueron adquiridos en Scharlau (Barcelona,

hasta 50 mg l^{-1} , resultando ser lineales para todos los compuestos, obteniéndose límites de detección y cuantificación bajos.

Se estudió la influencia del sexo de los paciente, su edad y del tiempo de permanencia sobre las concentraciones de los diferentes compuestos mediante un análisis de regresión.

El programa estadístico utilizado es el Statgraphics versión Plus 5.1 (Manugistics, Inc, Dallas, EEUU).

RESULTADOS

Las concentraciones de los diferentes compuestos lipídicos aparecen en la tabla II. En algunos casos no hay valores por encontrarse concentraciones inferiores al límite de detección. Esta situación fue especialmente llamativa en el caso del α -tocoferol, donde solo pudieron cuantificarse concentraciones en 7 de las 23 muestras.

No se observaron diferencias significativas en cuanto al sexo en relación con los diferentes compuestos. Respecto a la edad se encontraron únicamente diferencias significativas en las concentraciones de ácido retinoico, que disminuyen al

aumentar la edad de los pacientes ($p = 0,023$) (fig. 3). En cuanto a las concentraciones en función del tiempo de permanencia, únicamente se registraron diferencias significativas en las de colesterol ($p = 0,0008$) (fig. 4), que se elevó de forma gradual hasta los 20 meses.



Fig. 3: Concentraciones de ácido retinoico en función de la edad de los pacientes. Existe una relación inversa significativa $p=0,023$.

Tabla II. Concentraciones de los diferentes compuestos expresadas en $\mu\text{g/g}$

Muestra	Ac. Retinoico	Retinol	Retinal	Colesterol	Tocoferol
1	0,02	—	0,07	7,67	—
2	0,03	0,01	0,11	9,89	—
3	0,06	3,78	1,59	36,13	—
4	0,13	—	0,03	5,54	—
5	0,03	0,16	0,02	33,96	0,08
6	0,04	1,64	0,32	49,19	—
7	0,03	0,17	0,09	23,39	—
8	0,03	1,43	—	49,05	—
9	0,03	0,07	—	38,24	—
10	0,02	0,08	0,02	53,78	0,11
11	0,04	0,12	0,04	28,69	0,29
12	0,02	0,12	0,07	24,57	—
13	—	0,65	1,07	87,22	—
14	0,13	0,86	2,74	90,29	—
15	0,08	—	0,05	69,30	0,03
16	0,06	0,03	0,46	69,48	0,77
17	0,03	0,17	0,14	61,98	0,12
18	0,16	0,42	0,35	98,88	—
19	0,05	—	0,01	58,40	0,25
20	0,05	1,09	0,80	94,21	—
21	0,05	0,14	0,12	30,96	—
22	0,28	0,99	1,53	33,13	—
23	0,02	0,12	0,12	61,15	—

—: cantidades inferiores al límite de detección

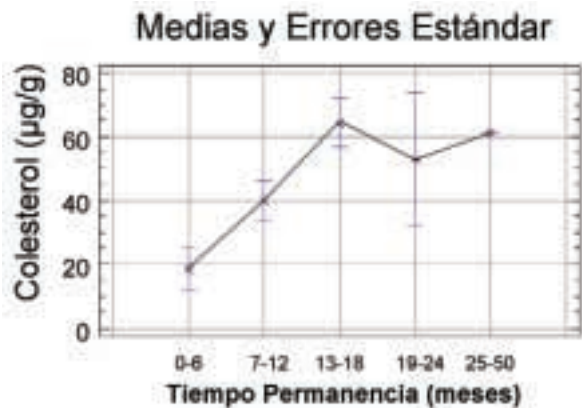


Fig. 4: Concentraciones de colesterol en función del tiempo de permanencia intraocular del aceite de silicona. Hay una relación estadísticamente significativa $p=0,0008$.

DISCUSIÓN

La elección de los compuestos lipídicos que se han estudiado en este trabajo se realizó en base a las indicaciones del trabajo inicial de Refojo (8) y a los parámetros de solubilidad de sustancias lipofílicas presentes en la retina y por lo tanto presuntas dianas para ser disueltas por el SiO durante su permanencia intraocular. Los retinoides (retinol, retinal y ácido retinoico), se encuentran en los vertebrados fundamentalmente en el epitelio pigmentario de la retina y en los fotorreceptores (11). El papel del retinol en el ciclo visual es de sobra conocido, pero hay que tener en cuenta que el retinol, en forma de 11-cis retinal se encuentra en el cromóforo y que tras su transformación a «*all-trans retinol*», es transportado al epitelio pigmentario de la retina donde se realiza el proceso de regeneración (11). Por su parte el ácido retinoico desempeña un papel importante en el funcionamiento de muchas células (12) donde parece actuar regulando la expresión de determinados genes. La vitamina A, en forma de retinol es captada por la célula que la oxida a ácido retinoico que es capaz de difundir al núcleo y unirse a receptores nucleares (12). Esta sustancia, disuelta en SiO, se ha utilizado en un modelo experimental de vitreorretinopatía proliferante para inhibir la proliferación celular, aprovechando precisamente su liposolubilidad relativamente alta (13). Respecto al α -tocoferol, que también forma parte de las vitaminas liposolubles resulta esencial para la

integridad de las membranas celulares, y actúa como agente antioxidante (14).

Por su parte el colesterol y sus ésteres con ácidos grasos de cadena larga son componentes importantes de las lipoproteínas de todas las membranas celulares y no solo de la retina (11).

Los resultados de este trabajo confirman que el SiO es capaz de extraer estos lípidos de los tejidos intraoculares. Esta extracción lipídica puede afectar no solo a las propiedades físicas del aceite si no a la propia funcionalidad de la retina y confirma que la silicona no es una sustancia tan inerte como aparece en la literatura (8).

Como ya se ha mencionado, la toxicidad de la silicona sobre la retina ha sido motivo de controversia desde el inicio de la utilización de esta sustancia como sustitutivo vítreo y aunque no hay un consenso en la literatura, en estos momentos se acepta que el aceite de silicona produce una respuesta inflamatoria intraocular mantenida (6,15,16) y nuestro grupo ha publicado otros trabajos que implican de forma indirecta a esta sustancia en otras manifestaciones de carácter inflamatorio, más generalizadas (17,18).

Además y como ya se ha comentado, hay trabajos experimentales que han demostrado la pérdida de las capas externas de la retina, lesiones en la capa de células ganglionares, e incluso presencia del SiO a nivel del nervio óptico (9,19). Y algunos trabajos han demostrado reducciones en las ondas a y b del electroretinograma (20) todo lo cual apoya la idea de la toxicidad retiniana de esta sustancia.

A pesar de lo anterior, y de la reciente aparición de las denominadas siliconas «pesadas», el SiO sigue siendo en estos momentos la única alternativa válida para tratar determinados cuadros complejos de la patología vítreo-retiniana y aunque es importante conocer sus efectos adversos, sería más interesante, a nuestro juicio, disponer de una clara orientación del tiempo que puede permanecer en el interior del ojo, sin causar daños irreversibles. En este sentido al menos en lo que respecta al colesterol, hay una elevación de sus concentraciones en función del tiempo de permanencia, aunque este trabajo no permite establecer su significado patológico.

No se ha encontrado una explicación para la relación inversa que se ha detectado entre la edad de los pacientes y los niveles de ácido retinoico, hallazgo que debería ser corroborado con estudios posteriores.

En síntesis, se ha confirmado que el SiO es capaz de extraer compuestos lipídicos del interior del ojo, fundamentalmente de la retina, lo que permite afirmar que no es una sustancia inerte aunque no implica que sea igualmente tóxica.

Se necesitan más estudios en este sentido, al menos mientras siga siendo el sustitutivo vítreo de larga evolución mas empleado.

BIBLIOGRAFÍA

1. Cibis PA. *Symposium: present status of retinal detachment surgery. Vitreous transfer and silicone injections. Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol* 1964; 68: 983-987.
2. Peyman GA, Schulman JA. *Vitreous substitutes. East Norwalk. Connecticut: Appleton and Lange. 1995; 1: 1-52.*
3. Gabel VP, Kampik A, Burkhart J. *Analysis of intraocularly applied silicone oils of various origins. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1987; 225: 160-162.
4. Pastor JC, López MI, Alonso JI, Nakamura K, Fernández M. *Efectos biológicos de los componentes de bajo peso molecular del aceite de silicona. Arch Soc Esp Ophthalmol* 1990; 59: 271-276.
5. Nakamura K, Refojo MF, Crabtree DV, Pastor J, Leong FL. *Ocular toxicity of low-molecular-weight components of silicone and fluorsilicone oils. Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991; 32: 3007-3020.
6. Pastor JC, Zarco JM, Del Nozal MJ, Pampliega A, Marinero P. *Clinical consequences of the use of highly purified silicone oil. Comparative study of highly and less purified silicone oil. Eur J Ophthalmol* 1998; 8: 179-183.
7. Karel I, Filipec M, Vrabec F, Obenberger J. *The effect of liquid silicone on the corneal endothelium in rabbits. A comparative specular microscopic and histopathologic study. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1986; 224: 481-485.
8. Refojo MF, Leong FL, Chung H, Ueno, Nemiroff B, Tolentino FI. *Extraction of retinol and cholesterol by intraocular silicone oils. Ophthalmology* 1988; 95: 614-618.
9. Doi M, Refojo MF. *Histopathology of rabbit eyes with silicone-fluorsilicone copolymer oil as six months internal retinal tamponade. Exp Eye Res* 1995; 61: 469-478.
10. Bañez Hidalgo C, Pastor Jimeno JC, Saornil Álvarez MA, Méndez Díaz MC, Martín Aparicio F, Rodríguez de la Rúa Franch E, et al. *Estudio experimental sobre la utilidad del aceite de copolímero de silicona-fluorsilicona (SiFo) en la cirugía vitreoretiniana. Arch Soc Esp Ophthalmol* 2004; 79: 205-212.
11. Forrester JV, Dick AD, Mc Menamin PG, Lee WR. *The Eye. Basic Sciences in Practice. 2nd Edition. Edinburgh: W.B. Saunders; 2002.*
12. Edwards RB, Aldler AJ, Dev S, Claycomb RC. *Synthesis of retinoic acid from retinol by cultured rabbit Muller cells. Exp Eye Res* 1992; 54: 481-490.
13. Araiz JJ, Refojo MF, Arroyo MH, Leong FL, Albert DM, Tolentino FI. *Antiproliferative effect of retinoic acid in intravitreal silicone oil in an animal model of proliferative vitreoretinopathy. Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993; 34: 522-530.
14. Hunt DF, Organisciak DT, Wang HM, Wu RL. *alpha-Tocopherol in the developing rat retina: a high-pressure liquid chromatography analysis. Curr Eye Res* 1984; 3: 1281-1288.
15. López MI, Alonso JI, Saornil MA, Goldaracena MB, Pastor JC, Refojo MF. *Análisis experimental de la reacción inflamatoria provocada por las siliconas fluoradas a nivel intraocular. Arch Soc Esp Oftal Invest* 1989; 2: 149-154.
16. Pastor JC, López MI, Saornil MA, Refojo MF. *Intravitreal silicone and fluorsilicone oils: pathologic findings in rabbit eyes. Acta Ophthalmol* 1992; 70: 651-658.
17. Pastor JC, Puente B, Telleria JJ, Carrasco B, Sanchez H, Nocito M. *Antisilicone antibodies in patients with silicone implants for retinal detachment surgery. Ophthalmic Res* 2001; 33: 87-90.
18. Sanabria Ruiz-Colmenares MR, Rodríguez de la Rúa Franch E, Aragón Roca J, Calonge Cano M, Saornil Álvarez MA, Pastor JC. *¿Puede aumentar el riesgo de oftalmía simpática el uso intraocular de aceite de silicona? Arch Soc Esp Ophthalmol* 2003; 78: 39-42.
19. Mukai N, Lee PF, Schepens CL. *Intravitreal injection of silicone: an experimental study. II. Histochemistry and electron microscopy. Ann Ophthalmol* 1972; 4: 273-287.
20. Meredith TA, Lindsey DT, Edelhauser HF, Goldman AI. *Electroretinographic studies following vitrectomy and intraocular silicone oil injection. Br J Ophthalmol* 1985; 69: 254-260.