

01674

30

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**



**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

LOCALIZACIÓN DE LAS ISOFORMAS DE LA
SINTASA DEL ÓXIDO NÍTRICO TIPOS 1, 2, 3
Y DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE ENDOTELINA - 1 EN
OJOS DE PERROS NORMALES Y CON GLAUCOMA PRIMARIO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A :

RAÚL REBOLLEDO MARTÍNEZ

TUTOR:

DR. GUSTAVO ADOLFO GARCÍA SÁNCHEZ

COMITÉ TUTORAL:

DR. FERNANDO CONSTANTINO CASAS
DR. VICENTE DÍAZ SÁNCHEZ

México, D.F.

2003

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE GENERAL

	pág
Introducción	1
Clasificación del glaucoma en perros	2
Signos clínicos del glaucoma	2
Diagnóstico del glaucoma	3
Tratamiento del glaucoma	4
El proceso neurodegenerativo	4
Óxido nítrico y Endotelina 1 en el proceso neurodegenerativo del glaucoma	7
Isoformas de la sintasa del óxido nítrico	8
Endotelina 1	9
Neuroprotección en glaucoma	11
Justificación	13
Hipótesis	14
Objetivo general	15
Objetivos específicos	15
Material y métodos	16
Resultados	24
Discusión	33
Conclusiones	36
Revisión bibliográfica	37

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: PAUL RESOLVEDO MTZ

FECHA: 31 OCT 2003

FIRMA: [Firma manuscrita]

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS	pág.
Cuadro 1. Nomenclatura de las sintasas del óxido nítrico.	9
Cuadro 2. Parámetros de perros normales antes de la cirugía, incluyendo los niveles de endotelina 1 en el humor acuoso.	29
Cuadro 3. Parámetros de perros glaucomatosos antes de la cirugía, incluyendo los niveles de endotelina 1 en el humor acuoso.	30
Fotomicrografía 1 y 2. Sintasa de óxido nítrico 1 en retina en ojo de perro normal y glaucomatoso.	27
Fotomicrografía 3 y 4. Sintasa de óxido nítrico 1 en cuerpo ciliar en ojo de perro normal y glaucomatoso.	27
Fotomicrografía 5 y 6. Sintasa de óxido nítrico 3 en retina en ojo de perro normal y glaucomatoso.	28
Fotomicrografía 7 y 8. Sintasa de óxido nítrico 3 en cuerpo ciliar en ojo de perro normal y glaucomatoso.	28
Fotomicrografía 9 y 10. Sintasa de óxido nítrico 2 en retina en ojo de perro normal y glaucomatoso.	29
Fotomicrografía 11 y 12. Sintasa de óxido nítrico 2 en cuerpo ciliar en ojo de perro normal y glaucomatoso.	29
Fotomicrografía 13 y 14. Sintasas de óxido nítrico 1 y 2 en músculo ciliar de ojo de perro normal.	30
Fotomicrografía 15 y 16. Sintasas de óxido nítrico 2 en endotelio corneal en ojo de perro normal y glaucomatoso.	30

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

RESUMEN

En este trabajo se muestra la presencia y las alteraciones en la distribución de las sintasas del óxido nítrico (SON) 1, 2 y 3 en las células de las retinas de ojos de perros física y oftalmológicamente normales, así como en aquellos perros que presentaban glaucoma primario bilateral. La identificación de las isoformas se realizó utilizando la técnica de inmunohistoquímica. Se observó una sobreexpresión de las tres sintasas en las retinas de ojos de perros con glaucoma primario cuando se les comparo con las retinas de ojos de perros normales. Cuando se compararon los niveles de endotelina 1 (ET 1) en el humor acuoso de perros normales y glaucomatosos, se encontraron diferencias significativas ($P=0.0084$), siendo los valores de 2.33 ± 0.90 y 8.11 ± 5.03 pg/mL respectivamente. El efecto de la edad no tuvo correlación significativa ($P=0.6283$). La variabilidad encontrada dentro del grupo glaucomatoso, podría ser explicado por el grado de daño a la retina ($P=0.0006$). No hubo correlación significativa entre la presión ocular y los niveles de endotelina 1 en el humor acuoso dentro del grupo glaucomatoso ($P=0.29$). La sobreexpresión de las isoformas 1, 2 y 3 del óxido nítrico (ON) en las retinas y las altas concentraciones de endotelina 1 (ET 1) en el humor acuoso de los ojos de perros con glaucoma podrían estar involucradas en el déficit autorregulatorio local vascular y favorecer el desarrollo neurodegenerativo y perpetuante del glaucoma.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INTRODUCCIÓN

Definición de glaucoma en los perros.

Tradicionalmente el glaucoma se define como un síndrome ocular que se caracteriza por un incremento de la presión intraocular incompatible con la fisiología ocular, esto podría ser ocasionado por una incapacidad de realizar el drenaje del humor acuoso a través de la hendidura ciliar, o por la producción excesiva de humor acuoso (raro en perros) por el cuerpo ciliar (1). Actualmente el glaucoma se define como una neuropatía crónica progresiva asociada con una pérdida gradual de la visión que culmina en ceguera (2). A pesar de realizar tratamientos médico quirúrgicos para controlar la presión intraocular, los elevados niveles de aminoácidos excitotóxicos, la alta liberación de óxido nítrico, los déficits en la perfusión de la microcirculación de la cabeza del nervio óptico, las fallas en la autorregulación vascular, la privación de neurotrofinas y las anomalías en el material extracelular que compone la lámina cribosa escleral son otros factores de riesgo que contribuyen a perpetuar el daño al nervio óptico y a la retina en el glaucoma (2,3,4). En humanos este proceso neurodegenerativo ha sido identificado independientemente de la presión intraocular, es decir, se ha diagnosticado glaucoma normotenso. Al igual que cualquier otro tipo de neuropatías los glaucomas son un grupo de enfermedades relacionadas por diversos mecanismos, los cuáles favorecen alteraciones en la perfusión vascular de la cabeza del nervio óptico, la axotomía de las células ganglionares de la retina, con el consecuente bloqueo axoplásmico ortogrado y retrógrado, el daño excitotóxico local y finalmente el proceso apoptótico (4,5,6,8).

Clasificación del glaucoma en perros.

El glaucoma se clasifica clínicamente en glaucoma primario de ángulo abierto, glaucoma primario de ángulo estrecho, glaucoma goniodisgénico y glaucoma secundario (9,10,11).

El glaucoma primario de ángulo cerrado fue identificado por primera vez por Magrane en Estados Unidos de América en 1957, en un perro de la raza Cocker Spaniel Americano (12). Se caracteriza por elevaciones insidiosas y crónicas de la presión intraocular, es también una condición relacionada con la raza de heredabilidad variable, las más afectadas son: Cocker Spaniel Americano e Inglés, Beagle,

Basset Hound, Poodle Toy y Miniatura, Elkhound Noruego, Samoyedo, Springer Spaniel Inglés, Husky Siberiano y Bouvier de Flandres. Los animales enfermos presentan uno o ambos ojos afectados y no existe una clara tendencia en cuanto a la relación de género (2,9,10,13).

Se han realizado investigaciones extensas en cuanto a las características morfológicas del ángulo iridocorneal en las diferentes razas predispuestas a glaucoma, también ha sido propuesto un mecanismo primario de la composición de la colágena estructural de la red trabecular y de la lámina cribosa que participan en el proceso hipertensivo ocular, sugiriendo un proceso fisiopatológico más extenso y general en el proceso neurodegenerativo, que simplemente el incremento en la presión intraocular (34,14,15,16,17).

Signos clínicos del glaucoma.

En el glaucoma las elevaciones en la presión intraocular son incompatibles con la salud del ojo, estas pueden ser insidiosas y modestas (30 a 45 mm Hg) o aguda y usualmente alta (50 mm Hg ó más), recordando que el incremento de la presión es un signo y no la enfermedad *per se* (10,11,13).

Al examen físico es posible detectar decremento en la capacidad visual o ceguera, pupilas dilatadas, congestión episcleral, opacidad corneal y globo ocular aumentado de tamaño, sobre la base de estos hallazgos se debe establecer el diagnóstico diferencial con respecto a otros problemas oftalmológicos (9,11,13,19).

En contraste con humanos adultos, en el perro, conejo, caballo, primates no humanos y niños, el glaucoma favorece el incremento de tamaño del globo ocular, esto es conocido como megaloglobus, hidroftalmos o buftalmia. En glaucomas crónicos los ojos buftalmicos regularmente son hipotensos y presentan presiones intraoculares menores a 5 mm Hg, esto debido a la atrofia del cuerpo ciliar (10,11).

La midriasis es un signo consistente en los glaucomas, a excepción del glaucoma con un componente uveítico. Cuando la presión intraocular rebasa la presión diastólica vascular se presenta hipoperfusión y sobreviene la isquemia al cuerpo del iris. La dilatación del iris no es siempre un signo de ceguera, ya que la atrofia del iris puede anteceder a la isquemia y daño retiniano. Las opacidades corneales observadas en el glaucoma tienen tres orígenes, edema, ruptura de la membrana de Descemet (líneas de Haab) y queratitis crónica por exposición, esta última favorece la formación de neovascularización y opacificación. En el cuerpo ciliar sobreviene

degeneración y atrofia durante los glaucomas crónicos. Al estar incrementada la presión intraocular (PIO) causa cambios permanentes en la retina y en el nervio óptico que dan como resultado ceguera permanente. Los cambios en el fondo de ojo de los perros con glaucoma, son similares a los encontrados en humanos y gatos siendo común encontrar un daño progresivo en las capas internas de la retina, principalmente en las células ganglionares (20).

Diagnóstico del glaucoma.

Existen varios procedimientos para el diagnóstico y valoración del tipo de tratamiento del glaucoma. La tonometría, la gonioscopia, la tonografía, la oftalmoscopia, la fluorangiografía y la electrorretinografía resultan indispensables (2;9,13).

La tonometría es un determinante muy importante en el diagnóstico de glaucoma, la presión intraocular normal en el ojo del perro es de 15 a 25 mm de Hg. Es posible valorar la presión intraocular de manera digital al colocar los dedos índices en la parte dorsal de los párpados superiores y presionando los globos oculares, esta es una manera burda de realizar la medición y solo arroja información si la presión está realmente elevada. De forma objetiva la tonometría con tonometro de aplanación al correlacionar la fuerza deformante de la superficie ocular con la presión intraocular, esto también nos facilita la respuesta a la terapia antiglaucomatosa.

La gonioscopia es la examinación ocular del ángulo iridocorneal al colocar un goniolente corneal que permite la visualización de la hendidura ciliar y de los ligamentos pectíneos, esto permite establecer la diferencia entre un ángulo normal un ángulo estrecho o un ángulo disgénico y por ende el tipo de glaucoma y el tratamiento a seguir (21).

La oftalmoscopia indirecta permite la observación del fondo de ojo por medio de una lente de aumento y una fuente de luz, con ello puede examinar las estructuras que conforman el fondo de ojo, retina, coroides y nervio óptico. Es indispensable realizar el examen en ambos ojos. Un ojo glaucomatoso presenta la cabeza del nervio óptico excavada, adelgazamiento de la retina que da apariencia de hiperreflectividad, así como adelgazamiento de los vasos sanguíneos retinianos (13).

Tratamiento del glaucoma.

Los tratamientos aun, estan enfocados medica o quirúrgicamente a reducir la presion intraocular aumentada (PIO) considerada como el factor de mayor importancia en la progresión de la enfermedad. Sin embargo, hay un conocimiento generalizado entre todos los clínicos, que a pesar de mantener un exitoso resultado en el control de la presión intraocular, existe progresión en la disminución de los campos visuales que en algunas ocasiones finaliza en la pérdida absoluta de la visión (7,8).

Proceso neurodegenerativo en glaucoma.

La muerte de los cuerpos celulares de las neuronas, se suscita de manera irremediable una vez que la lesión ocurrió sobre el axón, sea esta primaria o secundaria e independiente del mecanismo. Dentro de los procesos que inducen la muerte de las neuronas se ha observado la deprivación de substancias tróficas, aminoácidos excitotóxicos, la elevación del calcio intracelular, producción de óxido nítrico y alta concentración de radicales libres. La muerte celular de los cuerpos ganglionares es apoptotica por excelencia durante la retinopatía glaucomatosa (4,22,23,24,25,26).

La muerte celular puede suscitarse por cualquiera de los dos caminos conocidos, necrosis o apoptosis.

Necrosis: (muerte "accidental" celular) es un proceso patológico que ocurre cuando las células son expuestas a severos daños físicos, químicos o biológicos.

Apoptosis: (muerte "normal" o "programada") es un proceso fisiológico por el cuál las células que ya no son requeridas para el funcionamiento de un tejido, son eliminadas durante el desarrollo u otros procesos biológicos normales.

Citotoxicidad: Es la propiedad para matar una célula por parte de ciertos compuestos químicos (farmacéuticos, cosméticos o alimenticios) o estar mediada por células (células T citotóxicas). En contraste con necrosis y apoptosis no indica un mecanismo específico de muerte celular. Por ejemplo, las células que median la citotoxicidad son los linfocitos T citotóxicos (LT) o células asesinas (CA). Estas células combinan algunos aspectos de necrosis o apoptosis durante su actividad (18,27). Existen muchas diferencias morfológicas y bioquímicas entre necrosis y apoptosis, necrosis ocurre cuando las células son expuestas a variaciones extremas desde fisiológicas (p. ej. hipotermia, hipoxia) lo que puede resultar en daño a la membrana

citoplasmática, bajo condiciones patológicas, el daño directo lo realizan agentes como el complemento y virus líticos. La necrosis celular se inicia cuando hay una incapacidad de la célula para mantener la homeostasis, lo cuál lleva a la entrada de agua e iones extracelulares. Los organelos celulares, en especial la mitocondria y la totalidad de la célula se hincha y se rompe (lisis celular), debido a esta ruptura de la membrana, se liberan el contenido intracelular y junto con ello enzimas lisosomales hacia el medio extracelular, por lo tanto, *in vivo*, la necrosis es comúnmente asociada con un extenso daño de los tejidos, resultando en una intensa respuesta inflamatoria (17,19).

Por el contrario en las células que sufren apoptosis, se observa un modelo de muerte celular que ocurre bajo condiciones fisiológicas normales y la célula es un participante activo de su propia destrucción ("suicidio celular"), es encontrada con más frecuencia durante el recambio celular normal y la homeostasis, embriogénesis, la inducción o mantenimiento de la tolerancia inmunológica, el desarrollo del sistema nervioso así como la atrofia tisular endocrinodependiente. Una característica fundamental en el desarrollo de la apoptosis es la activación proteolítica de unas proteínas llamadas caspasas, el estadio final de la apoptosis es llamado ejecución y ocurre a través de la activación y función de estas caspasas, los genes que controlan la apoptosis son parte de un mecanismo simple de vida o muerte encontrado en la mayoría de las células de los seres vivos. (8,26).

Las células que sufren apoptosis muestran características morfológicas y bioquímicas específicas, estas características incluyen agregación de la cromatina, condensación nuclear y citoplasmática, partición del núcleo y del citoplasma en forma de vesículas (apoptosomas) que contienen los ribosomas y las mitocondrias morfológicamente intactas así como material nuclear. *In vivo*, estos apoptosomas son rápidamente fagocitados por macrófagos o células epiteliales adyacentes. Gracias a este eficiente mecanismo para remover células en apoptosis *in vivo* no se efectúa una respuesta inflamatoria. *In vitro*, los apoptosomas así como fragmentos celulares finalmente se hinchan y lisan, esta parte terminal *in vitro*, es conocida como "necrosis secundaria" (22,27,28).

Los estímulos que pueden favorecer la apoptosis en el glaucoma, son la privación de neurotrofinas por bloqueo retrógrado axonal, durante las elevaciones de la presión intraocular, esto sería equivalente a un evento mecánico traumático (16). Después de una lesión traumática en

el cerebro o en la retina, las neuronas y el tejido de soporte es particularmente susceptible a una lesión secundaria. Esto no solo ocurre en áreas lesionadas sino también en tejido neuronal adyacente (la penumbra) (17). El traumatismo (lesión primaria) dispara una serie de eventos interrelacionados, despolarización y flujos iónicos en neuronas y tejido de soporte (astrocitos y células gliales), disminución de energía (ATP), acumulación de glutamato, el cuál es un neurotransmisor que de manera directa o indirecta causa el acúmulo de calcio dentro de la célula, ya sea desde el medio extracelular o de los depósitos internos (29). El calcio eleva la actividad de enzimas intracelulares como la protein kinasa C, fosfolipasas, proteasas, endonucleasas y sintasas del óxido nítrico, de igual forma estas elevadas cantidades de calcio interfieren en el acoplamiento de la fosforilación oxidativa favoreciendo la ineficiencia del ATP y disminución de los depósitos del mismo. Una característica peculiar del glaucoma es que el daño neuronal parece perpetuarse sólo en las células ganglionares como resultado del daño primario. Los neurotransmisores se encuentran en pequeñas cantidades, sin embargo, durante el glaucoma el glutamato se acumula en elevadas cantidades dentro de la retina y el humor vítreo. Glutamato es reactivo con receptores presentes en las células ganglionares, el más estudiado es el receptor N-metil-D-aspartato (NMDA). Dos menos estudiados son DL alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxalona del ácido propiónico (AMPA) y el receptor kainato. Se ha investigado al glutamato en enfermedades cómo Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica y enfermedad de Huntington. La elevada cantidad de glutamato en glaucoma puede deberse a isquemia, hipoglicemia o trauma directo. El glutamato extracelular es regulado a través de transportadores localizados en la membrana de neuronas y glía, cuando el glutamato está involucrado en la lesión neuronal se debe sospechar de la alteración de estos transportadores. El transportador del glutamato, EAAT1 está disminuido en ojos glaucomatosos. La sobreestimulación de NMDA favorece la activación de canales de calcio que pueden entrar al interior de la célula e incrementar su nivel y comenzar el estímulo de diversas enzimas intracelulares (64), la sintasa del óxido nítrico se activa y comienza a producir óxido nítrico (ON) a partir de arginina, el cuál actúa como radical libre para formar peroxinitrito (OONO⁻). La activación de otros receptores de glutamato (AMPA/kainato) despolariza la membrana celular de las células

ganglionares de la retina y con ello movilización de magnesio lejos del receptor NMDA y con ello mayor entrada de calcio (8,15,29,30,31).

El óxido nítrico (ON) y la endotelina 1 (ET-1) en el proceso neurodegenerativo del glaucoma.

A finales de los años ochenta se describió una actividad inesperada de la arginina como precursor de un nuevo segundo mensajero y neurotransmisor, sin embargo, por más de un siglo se utiliza terapéuticamente por sus efectos vasodilatadores al emplear nitroglicerina en el manejo de enfermedades de las arterias coronarias (32,33). Este nuevo compuesto se ha identificado como un gas, el óxido nítrico (ON), que se produce a partir de la arginina mediante una oxidación de cinco electrones sin precedentes que da lugar también a citrulina. La enzima sintasa del óxido nítrico (SON), contiene unido FMN, FAD, hierro no hemo y tetrahidrobiopterina, una sustancia relacionada con el tetrahidrofolato que se identificó originalmente como cofactor de la síntesis de tirosina a partir de fenilalanina. La estimulación del receptor de la membrana celular por medio de un agonista (p. ej. acetil colina) favorece un incremento de calcio intracelular lo que a su vez activa la enzima del óxido nítrico. El ON es un gas radical libre, lipofílico de rápida difusión y no almacenable, el óxido nítrico producido en las células endoteliales difunde y penetra rápidamente en las células vecinas.

El óxido nítrico es un mensajero químico difusible que participa en un rol crítico en la regulación de la transmisión neuronal, vasodilatación, plasticidad neuronal así como toxicidad neuronal. El óxido nítrico es producido por algunas isoformas de sintasa del óxido nítrico. La forma constitutiva, libera bajas cantidades de óxido nítrico durante cortos periodos de tiempo y normalmente está localizada en neuronas y células endoteliales. La forma inducible produce altas cantidades de óxido nítrico durante periodos largos de tiempo y es comúnmente encontrada en macrófagos. Después de un traumatismo, elevadas cantidades de óxido nítrico producido por sintasa inducible, han sido detectadas en lesiones del sistema nervioso central. Las células de la microglía y astrocitos son las responsables de la producción de este tipo de isoforma (34,36,37).

El óxido nítrico juega un rol muy importante en la perfusión cerebral, en especial cuando existe hipotensión y/o isquemia focal. Existen variaciones normales en cuanto a la respuesta vasodilatadora a la

hipertensión, ya que estas están mediadas por el óxido nítrico (ON) debido a su capacidad mecánica vasoactiva.

La producción de óxido nítrico y su acción vasodilatadora depende de dos rangos de presión, siendo su mayor producción y acción dentro del rango menor a través de la sintasa del óxido nítrico de origen endotelial. En un número limitado de especies animales se ha observado marcada heterogeneidad de la sintasa del óxido nítrico a través de inmunorreactividad. Al ser muy inestable posee una vida media de unos cuantos segundos por lo tanto tiene un área de actividad cercana al sitio de producción. ON puede reaccionar con oxígeno para formar nitritos o nitratos ($O_2 + ON = NO_3^- / NO_2^-$), hemoglobina participa como recolector de ON, con anión superóxido forma peroxinitritos y radical hidroxilo. Cuando ON alcanza las células del músculo liso activa la enzima guanilato ciclasa, responsable de la formación de 3'5'-guanilato cíclico monofosfato cGMP lo que ocasiona relajación celular al reducir la presencia de calcio intracelular (38,39).

Isoformas de la sintasa del óxido nítrico.

En adición a la sintasa del óxido nítrico de origen endotelial (SONe), existen otras dos (Cuadro 1) (40), una de ellas es de origen neuronal SONn la cuál puede ser encontrada en neuronas no colinérgicas-no adrenérgicas, responsables de la relajación de fibras musculares lisas y como consecuencia vasodilatación (p. ej. intestino, circulación ocular y cerebral), ambas son muy similares ya que son calcio y calmodulina dependientes, por lo tanto se incrementan de manera proporcional con los niveles de calcio intracelular. En la retina el ON es un mediador fisiológico que es utilizado por los conos, células bipolares, células amacrinas y células ganglionares. La SONE es estimulada por receptores de membrana activados por determinadas moléculas (p. ej. acetil colina, histamina, bradiquinina), SONn se produce por la estimulación post sináptica de glutamato. En contraste la tercera isoforma mayor, llamada inducible (SONi) no se expresa bajo condiciones normales, es solamente inducible bajo el estímulo de citocinas o productos bacterianos, tal como endotoxinas. El gen responsable de la síntesis de esta isoforma debe ser activado nivel nuclear y entonces la información transcrita a RNAm antes de ser trasladado a su actividad enzimática. SONi es involucrada en procesos inflamatorios. Macrófagos y neutrófilos después de ser expuestos a citocinas y productos bacterianos, horas después producen grandes cantidades de ON. Las mismas células producen

también anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) que al combinarse con ON producen peroxinitrito ($OONO^{\cdot}$), el cuál es mucho más inestable y produce el radical hidroxilo (OH^{\cdot}) utilizado para matar bacterias ingeridas. El ON ha sido involucrado en la vasodilatación no responsiva del choque endotóxico. Otra manera que posee el ON para generar daño celular, es por medio de la inactivación de enzimas involucradas en el transporte electrónico en la membrana mitocondrial al bloquear la acción de los centros de hierro y azufre.(41,42,44,45,46,48,50,55).

Cuadro 1 Nomenclatura de las Sintomas del óxido nítrico.

Designación preferida ^a			
Numérica	Descriptiva	Definición	Localización Cromosómica (Humanos)
I	SONnc	Depende de cantidades elevadas de Ca^{2+b} , el primer tipo identificada en neuronas.	12q24.2
II	SONi	Su actividad es independiente de la concentración de Ca^{2+b} en el medio.	17cen-q12
III	SONec	Depende de cantidades elevadas de Ca^{2+b} , el primer tipo identificada en células endoteliales.	7q35-36

^aAdaptado de Schmidt *et al.*(1991).

^b Por arriba del nivel basal celular (70-100nM).

Endotelina-1.

En contraste con ON, el cuál es un agente relajante, endotelina-1 es el más potente vasoconstrictor fisiológico conocido actualmente. Endotelina-1 es parte de una familia de pequeños péptidos compuesto por 21 aminoácidos con estructura análoga al veneno de abejas y serpientes, lo que sugiere un origen filogenético con esta molécula. Endotelina-1 es esencialmente producida en células endoteliales. Es

formada por un péptido precursor de aproximadamente 200 aminoácidos llamado proendotelina. Esta molécula es fragmentada por una endopeptidasa en un pequeño péptido de 38 aminoácidos llamado gran endotelina. El paso final es realizado por la enzima convertidora de endotelina (ECE) que fragmenta la gran endotelina en una molécula de 21 aminoácidos llamada endotelina, solo una pequeña parte de la endotelina producida por las células endoteliales es liberada al lumen vascular, lo que sugiere un acción local.

Existen dos receptores principales ET_A y ET_B en el músculo liso vascular, la estimulación del receptor ET_A es lo que proporciona la principal función vasoconstrictora. ET_A se observa ligado a fosfolipasa C, conocida por su capacidad de formar segundos mensajeros inositol fosfato (IP_3) y diacilglicerol. Activación de estos mensajeros puede llevar a incrementos de calcio intracelular a partir de reservas internas, en algunos vasos el calcio proviene de canales de calcio dependientes de voltaje. Estas elevadas cantidades de calcio permiten contracciones sostenidas (39,56).

La endotelina 1 puede ser importante en la regulación de la presión intraocular (PIO), se han encontrado niveles elevados de ET-1 en pacientes humanos con glaucoma de ángulo abierto (63), así como en el plasma de pacientes con glaucoma normotenso (65) lo que podría indicar una acción importante de ET-1 en la fisiopatología del glaucoma. Inyecciones intravítreas de ET-1 en conejos, causa elevaciones transitorias de la presión intraocular, seguidas de hipotensión ocular sostenida (67), por otro lado inyecciones repetidas de ET-1 en el vítreo de conejos, reduce el flujo sanguíneo de arterias ciliares a la cabeza del nervio óptico, dando como consecuencia alargamiento y excavación de la cabeza del nervio óptico sin aumento de la presión intraocular(71). El glaucoma en el perro en etapas tempranas es normotenso, posteriormente en las fases hipertensivas se asocia con estrechamiento o reducción del ángulo iridocorneal (15) para investigar la actividad de la endotelina 1 (ET-1) en el glaucoma del perro, fue medido el nivel de esta en el humor acuoso de perros sanos y perros con glaucoma.

El glaucoma es una neuropatía crónica y progresiva de la cabeza del nervio óptico asociada con diferentes factores de riesgo, tales como elevada presión intraocular o disfunción del flujo sanguíneo, tal como la reacción vasoespástica (72). Se cree que hay condiciones en donde por una falta de producción de ON se suscita una reacción vasoespástica. Como se había mencionado anteriormente la

activación de un receptor de membrana (acetil colina) produce incremento del calcio intracelular lo que estimula la activación de SON, la producción de ON, lleva a las fibras musculares de los vasos a relajarse, dando como consecuencia vasodilatación. Se debe notar que este mismo receptor (acetil colina) en las células del músculo liso, eleva los niveles de calcio intracelular el cual potencialmente lleva a la contracción de las fibras musculares. Bajo condiciones normales, este efecto vasoconstrictor es equilibrado por la producción de ON. De cualquier forma en condiciones de alteración del endotelio vascular la administración de un agonista puede favorecer más vasoconstricción en lugar de vasodilatación. Por otro lado, la producción local de ET puede orillar a la reacción vasoespástica. Por ejemplo, en células endoteliales humanas la producción de ET-1 puede ser estimulada por Ox-LDL una sustancia asociada con hipercolesterolemia, se ha observado reacción vasoespástica en arterias ciliares aisladas que son estimuladas con Ox-LDL, una manera de revertir este vasoespasmo es utilizando antagonistas de los receptores de endotelina-1(ET-1). Hay evidencia que la red trabecular tiene elementos contráctiles intrínsecos que pueden ser relajados por ON y contraídos por ET-1. Se ha sugerido que ON está involucrado en el incremento de la eliminación del humor acuoso y reducir la PIO, mientras que endotelina-1 (ET-1) incrementa la PIO. Al parecer ON y ET-1 no son moduladores principales de la PIO pero podrían estar involucrados de manera directa en la elevada PIO de pacientes con glaucoma normotenso, a causa de un incremento en la producción de ET-1 y un decremento de ON (39,57,58,59,60).

Neuroprotección en glaucoma.

Por más de un siglo el tratamiento del glaucoma se ha dirigido en la reducción de una elevada presión intraocular, algunos investigadores argumentan que la neuroprotección provee una estrategia terapéutica lógica adicional para el control integral del glaucoma. En la actualidad existe una plétora de información a partir de cultivos celulares y modelos animales que soportan el valor de esta estrategia neuroprotectora (22,64).

Como ejemplo, el suministro de neurotrofinas como el BDNF es potenciado en su efecto neuroprotector cuando es adicionado con N-omega-nitro-L-arginin-metil-ester (L-NAME), un inhibidor de la sintasa del óxido nítrico (SON), se han estudiado las drogas 7-nitroindazole y aminoguanidina, la cual selectivamente inhibe a la SONn, la

Cycloheximida (CHX) es un inhibidor de la síntesis de proteínas, que previene la muerte neuronal al protegerlas de daños oxidativos, esto lo realiza al estimular la expresión del gen de bcl-2 y enzimas antioxidantes. NNA (N-nitro-L arginine) es también un inhibidor de la sintasa del óxido nítrico (43,45,66).

Inmunohistoquímica.

Actualmente los laboratorios de anatomía patológica se están volviendo más sofisticados debido al rápido y constante desarrollo de nuevas técnicas que permiten la identificación más precisa y segura de un tipo celular o tisular, de su actividad secretora de sustancias, de estructuras extracelulares o de marcadores específicos.

Método ABC.

En 1979 Guesdon y cols.(74) Describieron dos métodos para la localización de antígenos basados en la interacción de biotina con avidina, este sistema explota la alta afinidad de unión que existe entre la avidina y la biotina. La avidina es una glicoproteína con un peso molecular de 68000 daltons, está presente en la clara de huevo, cuando se une con gran afinidad a la biotina, lo realiza en cuatro sitios de unión. La biotina es una vitamina hidrosoluble del grupo de la vitamina B₁ con un peso molecular de 244 daltons, que puede ser conjugada con la enzima peroxidasa, de modo que una molécula de peroxidasa puede ligarse a varias de biotina. Lo fundamental de este método estriba en la formación de un enorme complejo que incluye numerosas moléculas de peroxidasa, muchas más de las que se logran con otras técnicas. Esta amplificación de la inmunomarcación otorga al método una gran sensibilidad, lo que permite trabajar con altas diluciones del anticuerpo primario. Hsu *et al.* han desarrollado una modificación al sistema avidina-biotina, la cual puede ser usada como método directo e indirecto en la técnica indirecta, después del anticuerpo primario, se añade un anticuerpo secundario biotinilado y luego complejos preformados de avidina-biotina-peroxidasa en el sitio del antígeno del tejido. El método ABC ha probado ser de mucho valor, especialmente cuando se usa el indirecto para inmunoreacciones con anticuerpos monoclonales de ratón, en virtud de su alta sensibilidad (75).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

JUSTIFICACIÓN

A pesar de los avances médico-quirúrgicos en el tratamiento y el control del glaucoma primario en los perros, el proceso crónico neurodegenerativo finalmente lleva al individuo a la pérdida de la visión, por lo que este trabajo pretende señalar la importancia de algunas sustancias involucradas en este proceso y resaltar su importancia en la neuroprotección y neuroregeneración, como esquemas terapéuticos futuros.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

HIPÓTESIS

Los perros con glaucoma primario presentan incrementos en las concentraciones de la sintasa del óxido nítrico 1, 2 y 3 a nivel de las células ganglionares de la retina, así como niveles elevados de endotelina-1 en el humor acuoso.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

OBJETIVO GENERAL

1.- Investigar la distribución de las sintasas del óxido nítrico (ON) y la alteración en la producción de la endotelina-1 (ET-1) en perros con ojos normales y en perros con ojos glaucomatosos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1.- Identificar la distribución de las isoformas 1, 2 y 3 de sintasa del óxido nítrico (SON) en las células de la retina de perros con ojos normales y con ojos glaucomatosos por medio del método de inmunohistoquímica.

2.- Establecer los valores de la concentración de endotelina-1 en el humor acuoso de perros normales y con glaucoma a través del método de ELISA.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MATERIAL Y MÉTODOS

Evaluación Inmunohistoquímica.

Para el estudio inmunohistoquímico de las isoformas de óxido nítrico se obtuvieron 10 ojos de 5 perros afectados con glaucoma primario bilateral (4 a 7 años) tres hembras y 2 machos; en el grupo control fueron obtenidos 10 ojos de 5 perros, clínica y oftalmológicamente sanos (3 a 8 años) una hembra y 4 machos. Los perros del grupo control eran de la raza Cocker Spaniel, los perros del grupo afectado con glaucoma pertenecían a la raza Cocker Spaniel (3) y mestizos de Cocker Spaniel (1) y Poodle (1), peso promedio 9.4 Kg. (rango: 6.2 a 12.6 Kg.). Los perros con glaucoma primario fueron cedidos por propietarios que no contaban con la disposición y recursos para solventar los gastos del tratamiento, los perros sanos fueron donados por la coordinación de enseñanza quirúrgica, que depende del Departamento de Medicina Cirugía y Zootecnia para Pequeñas Especies de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Para determinar la presencia de glaucoma primario fue definido por examen oftalmológico el cuál se constituye de un examen con biomicroscopio (Kowa SL 14, Kowa Optimed, CA), tonometría (Tonopen, Mentor Ophthalmics, MA), gonioscopia, examen de fondo de ojo con oftalmoscopio indirecto, así como del nervio óptico a la examinación clínica (61). La tonometría de los perros normales fue en promedio de 16.8 +/- 4.0 mmHg, los perros con glaucoma hipertensivo fue superior a 25 mmHg. Los signos clínicos del glaucoma fueron congestión episcleral, pupilas midriáticas, excavación de la cabeza del nervio óptico y adelgazamiento de retina.

Se realizó inducción anestésica con tiopental sódico (10 mg/kg) se efectuó intubación y mantenimiento de la anestesia fija con pentobarbital sódico (25 mg/kg) y oxígeno (40 ml/kg) en sistema semicerrado, los perros fueron colocados en decúbito dorsal. Se realizó la enucleación de globo ocular mediante procedimiento convencional (9), se obtuvo la mayor cantidad de nervio óptico posible, posteriormente se sumergió en formalina al 4%, a cada globo ocular se le realizó una incisión a nivel escleral y corneal que permitió la penetración del fijador. Una vez que pasaron tres horas, se realizaron dos cortes sagitales paralelos al globo ocular de aproximadamente tres a cuatro milímetros de tal forma que el segmento ocular

contuviera al nervio óptico. Una vez efectuados los cortes, se sumergieron una vez mas en formolina al 4% y se mantuvieron por espacio de 48 hrs. A continuación se sumergieron en alcohol etílico al 70 % y se inicio proceso de deshidratación.

Parafinación.

Los segmentos de los ojos se guardaron en canastilla de parafinación se clasificaron y se sometieron al procesador automático de parafinación, histoquinette bajo el siguiente protocolo.

Alcohol etílico al 70% 1 hora.

Alcohol etílico al 80% 1 hora.

Alcohol etílico al 96 % 1 hora.

Alcohol etílico absoluto 1 hora.

Alcohol etílico absoluto 1 hora.

Xilol puro 1 hora.

Xilol puro 1 hora.

Xilol puro 1 hora.

Parafina (1) 1 hora.

Parafina (2) 1 hora.

Inclusión o bloqueo de muestra dentro de cassette.

Solidificación aprox. 30 minutos

Montaje de tejido.

En un microtomo se realizaron cortes histológicos de 3 a 4 micrómetros, se utilizaron portaobjetos silanizados.

Protocolo para silanizar portaobjetos.

Lavado de portaobjetos dentro de una canastilla, se utilizó agua corriente a chorro por espacio de 10 minutos.

Lavado con alcohol ácido, alcohol al 70 %+ 1mL de HCl al 1%, se sumergieron los portaobjetos de tres a cuatro veces, esto favoreció la desaparición de grasa sobre los portaobjetos.

Los portaobjetos se sumergieron en acetona en tres a cuatro ocasiones.

Horno Pasteur a 50-60° C, se secaron los portaobjetos.

Se retiraron del horno y se enfriaron a temperatura ambiente, se sumergieron en silano (3 amino, tri-etoxi, silano) marca Sigma. El

silano se preparo al 2%, se diluyó 20 mL de silano en 980 mL de acetona.

Se mantuvieron los portaobjetos dentro de la solución por espacio de 3 minutos.

Se lavaron los portaobjetos en agua destilada 3 a 4 movimientos por dos ocasiones.

Los portaobjetos se escurrieron y se llevaron al horno Pasteur para secado a 40° C durante una noche, los portaobjetos se guardaron dentro de cajas o contenedores.

Desparafinación

El grupo de portaobjetos silanizados con tejido montado se introdujeron en horno para incubación a 60° C, se mantuvieron dentro del horno durante una noche.

Se sumergieron en xilol puro por 5 minutos por tres cambios.

Acetona por 3 minutos.

Alcohol etílico absoluto por 3 minutos.

Eliminación de peroxidasas endógenas.

Metanol absoluto + peróxido de hidrógeno al 3 %, 1 litro de metanol más 30 mL de H₂O₂ al 30 % durante 30 minutos, esta solución ayudó a eliminar la peroxidasa tisular endógena y evitó reacciones de fondo durante la inmunohistoquímica.

Desenmascaramiento de antígenos.

Se colocaron los portaobjetos dentro de canastillas tipo Koplín, este se introdujo en un contenedor de plástico con un volumen aproximado de 500 mL el contenedor se llenó con amortiguador de citratos.

Protocolo de preparación del amortiguador de citratos:

Ac. Cítrico a 10 mM, ajustado a un pH de 5.7 a 6.0, se agregó 1mL de detergente twin 20 al 1 %, en 1 litro de amortiguador de citratos.

Se introdujeron los portaobjetos en un horno de microondas Sanyo-1000 watts, se programó el horno de microondas a 800 watts por espacio de 10 minutos, el horno alcanzó una temperatura de 90 a 95° C, se revisaron los contenedores, por espacio de 1 min Se dejaron reposar los portaobjetos, si hubo evaporación se rellenó el faltante con agua destilada, se continuó el calentamiento con 800 watts por 7 minutos. Se realizó la calibración del número de portaobjetos, bajo

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

este protocolo, se introdujo 3 contenedores de plástico con aproximadamente 100 portaobjetos cada uno.

Cuando terminaron los siete minutos se volvieron a revisar los portaobjetos, se dejaron reposar 40 minutos. Si hubo evaporación se rellenó una vez más con agua destilada a temperatura ambiente.

Se continuó con un lavado breve y gentil en agua corriente, esto fué con el objetivo de eliminar el excedente del amortiguador de citratos.

Se continuó con el amortiguador de fosfatos, 2 lavados de 5 minutos. cada uno.

Protocolo para preparar el amortiguador de fosfatos:

El amortiguador de fosfatos favoreció un pH estable y mantuvo las fuerzas electrostáticas uniformes, facilitando con ello el enlace antígeno anticuerpo.

9 g de cloruro de sodio.

6.17 g de fosfato de sodio dibásico.

0.89 g de fosfato de sodio monobásico.

Esto es fue preparar un litro de solución, se agrego 1 mL de detergente "twin" 20 a 1 litro de solución, este detergente es un humectante que favoreció la penetración del anticuerpo hacia el antígeno. Los elementos que componen el amortiguador de fosfatos se mezclaron en un aparato homogenizador.

Colocación del suero de bloqueo.

Se colocaron los portaobjetos en contenedores especiales que poseian la capacidad de almacenar hasta 20 portaobjetos dentro de una cámara húmeda, la cámara húmeda debió ser un recipiente de volúmen adecuado para contener un número determinado de carpetas, es importante haber mantenido la cámara húmeda y las carpetas en una superficie totalmente horizontal, utilizo un nivel de burbuja para calibrar la superficie de trabajo.

A cada portaobjetos se colocó 1 a 2 gotas de suero de bloqueo, este debio ser del tipo en donde se elaboraron los anticuerpos primarios, en este caso se utilizo suero de carnero, estas dos gotas fueron de aproximadamente 50 microlitros Este suero se debió mantener por espacio de 30 minutos en incubación a temperatura ambiente, el suero de carnero se utilizó para eliminar reacciones y cargas inespecificas.

Dilución de anticuerpos primarios

Se obtuvo la dilución ideal de un anticuerpo, para ello se debieron realizar diversas diluciones y pruebas en los tejidos oculares ya montados en los portaobjetos de tal forma que se logró un marcaje ideal en el antígeno específico sin haber provocado contraste de fondo.

Se utilizó como dilución apropiada 1:200 de las sintasas de óxido nítrico 1, 2 y 3. se emplearon anticuerpos policlonales de conejo de la marca Sta. Cruz Laboratories, Inc.

Ejemplo:

SON 2 a dilución 1:50

50 microlitros de SON 2 + 150 microlitros de amortiguador de fosfatos = dilución 1:200

Los portaobjetos se retiraron de la cámara de incubación, se decantó el excedente de suero de carnero, los portaobjetos se secaron con una gasa limpia alrededor del tejido, es importante que en cada procedimiento se haya mantenido húmedo el tejido del portaobjetos, es necesario haber evitado el contacto de la gasa o los dedos ya que estos pudieron haber desprendido el tejido.

Se colocaron 1 a 2 gotas del anticuerpo primario, los portaobjetos se incubaron dentro de la cámara húmeda a temperatura de refrigeración 4° C durante una noche, fue necesario también haber mantenido la superficie del refrigerador de manera horizontal, con esto se evito el escurrimiento de la solución con anticuerpos fuera del tejido ocular, durante la técnica de inmunohistoquímica, fue necesario haber utilizado un control negativo y un control positivo, el control negativo fue aquel portaobjetos que no recibió el anticuerpo primario, en su lugar se utilizó únicamente amortiguador de fosfatos, el control positivo fue un tejido ya conocido que a una dilución determinada del anticuerpo siempre dió marcaje positivo, en este caso se utilizaron cortes de retina de humano que previamente se habían identificado con marcaje positivo a las sintasas del óxido nítrico 1, 2 y 3.

Anticuerpos secundarios.

Los portaobjetos se retiraron de la cámara húmeda.

Se sumergieron en amortiguador de fosfatos en 3 ocasiones por 3 minutos cada una. Se colocó un anticuerpo específico en contra del anticuerpo primario, en este protocolo se utilizó anticonejo en dilución 1:400, se colocaron 50 microlitros en cada laminilla, se mantuvieron las laminillas dentro de cámara húmeda y se incubaron a temperatura ambiente por espacio de 30 minutos. A continuación siguieron 3 lavados con amortiguador de fosfatos, 3 minutos cada uno.

Sistema avidina-biotina

Se preparó el complejo avidina biotina peroxidasa.

70 microlitros de avidina.

70 microlitros de biotina.

6860 microlitros de amortiguador de fosfatos.

Se colocaron 50 microlitros del complejo avidina biotina peroxidasa sobre cada portaobjetos, se mantuvieron dentro de cámara húmeda temperatura ambiente por 30 minutos (53,54).

Preparación del revelador.

Se utilizó 3,3'-diamino bencidina (tetrahidroclorhidro) con un 97 % de pureza. Se prepararon 200 mL de solución diaminobencidina, se utilizaron 25 mg por cada 100 mL de amortiguador tris, el amortiguador tris se preparó utilizando 6.1 g de hidroximetil-amino-etano para un litro de agua destilada y ajustado a un pH de 7.4. El revelador DAB debió ser utilizado con mucho cuidado por su potencial carcinogénico, se debió utilizar guantes y cubrebocas, se colocaron los 50 mg de DAB dentro de papel filtro contenido en un embudo, el embudo se colocó en un soporte universal, por debajo debe haber un vaso de cristal, sobre la DAB se colocó el amortiguador tris y se filtró la diaminobencidina. Poco antes del revelado la solución DAB se mezcló con 60 microlitros de H_2O_2 por cada 100 mL de solución DAB, esto con la finalidad de evitar la oxidación temprana del revelador.

Revelado.

Los portaobjetos se retiraron de la cámara húmeda, se sometieron a tres lavados con amortiguador de fosfatos de 3 minutos cada uno. El revelador se vació en un contenedor para 5 portaobjetos, se colocaron los portaobjetos con pinzas de disección sin dientes, se mantuvieron los portaobjetos dentro del contenedor 5 minutos, paralelo al tiempo de revelado, los portaobjetos se evaluaron bajo microscopía de luz y con

ello se evitó el sobrerrevelado que pudo favorecer la aparición de fondo (marcaje inespecífico) en nuestros portaobjetos.

Contraste y deshidratación.

Se lavó con agua corriente por 30 segundos.

Solución con sulfato de cobre al 1 % por 10 minutos.

Se enjuagaron con agua destilada.

Hematoxilina de Hill 1 minuto

Se enjuagaron con agua corriente gentil 10 minutos.

Solución Scott (quita el exceso de hematoxilina) 1 minuto.

Se enjuagaron con agua corriente 10 segundos.

Alcohol etílico al 96 % 3 minutos.

Alcohol etílico absoluto 3 minutos.

Acetona 3 minutos.

Xilol 1, 3 minutos.

Xilol 2, 3 minutos.

Se montaron en resina y se les colocó un cubreobjeto.

Secciones representativas de todas las muestras fueron teñidas simultáneamente, con ello se evitó variaciones en las reacciones. La producción de los controles negativos se realizó al eliminar el anticuerpo primario del proceso de incubación, seguido del protocolo descrito. La inspección de los portaobjetos se realizó utilizando microscopía de luz.

Metodo de ELISA.

Las muestras de humor acuoso se obtuvieron de perros sanos (n=5) y de perros con glaucoma hipertensivo (n=10) Se extrajo el humor acuoso (0.1-.02 mL). Las muestras de humor acuoso se obtuvieron de perros clínica y oftalmológicamente sanos (n=5) y de perros con glaucoma hipertensivo (n=10). Las muestras en este grupo fueron tomadas de pacientes que fueron sometidos a un procedimiento quirúrgico ocular, la colección se realizó mediante punción aséptica a través del limbo con jeringa y se conservó en nitrógeno líquido a -70 grados centígrados hasta su posterior análisis. Los perros sanos para la evaluación del humor acuoso fueron adultos jóvenes mestizos (3 machos y dos hembras) (Cuadro 2). Los perros con glaucoma hipertensivo incluyó a 4 perros mestizos (Un macho de 9 años de edad, dos hembras de 9 años de edad y una hembra de 6 años de edad), un Bouvier de Flandres (hembra de 3 años de edad), 2 Huskies Siberianos (2 y 7 años de edad, machos), un Pastor Alemán (7 años

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

de edad, macho), un Beagle (11 años de edad, macho) y un Dálmata (11 años de edad, macho). Los ojos glaucomatosos tenían glaucoma primario, en un estado crónico de evolución, a excepción del Bouvier de Flandres que tuvo un ataque agudo de glaucoma, antes de la colección del humor acuoso (Cuadro 3).

El humor acuoso se valoró por medio de inmunoensayo enzimático (BBE5 Human Endothelin-1 parameter ELISA Kit; Rand D Systems, Minneapolis, MN), La endotelina-1 humana y endotelina-1 del perro poseyeron una secuencia similar de aminoácidos, lo cual fue validado por este kit (62). El kit fue evaluado en el plasma de los perros. El método obtenido en plasma para ET-1 fue adecuado para la examinación de una muestra mucho más pequeña y de constitución específica como la del humor acuoso. Se utilizó el análisis de varianza de dos vías para evaluar si los niveles de ET-1 en el humor acuoso de ojos sanos y ojos glaucomatosos, presentaban diferencia significativa. La variable independiente de interés primario fue el indicador de grupo (1= perros sanos, 2= perros glaucomatosos). El indicador de la edad (1= viejo, 2= joven) fue incluido como una covariante. La variable dependiente ET-1 fue transformada de manera logarítmica para mejorar el modelo. La prueba de correlación de Pearson fue usada para determinar cualquier correlación entre presión intraocular y niveles de endotelina-1. Se investigó si la variabilidad de los resultados de ET-1 en los ojos glaucomatosos fue debida al grado de daño de la retina, se utilizó análisis de varianza de una sola vía. Un valor de P menor a de 0.05 fue considerado significativo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESULTADOS

Para una valoración semicuantitativa del grado de inmunotinción de las muestras de los cinco ojos de perro normales y de los cinco ojos de perro con glaucoma primario bilateral, sometidos al proceso de inmunohistoquímica con anticuerpos policlonales de conejo y marcaje con DAB para la localización de las sintetas del óxido nítrico 1, 2 y 3, se decidió manejar la siguiente escala. Un grado alto de inmunotinción (+++) si existían arriba de cincuenta células positivas por campo; un grado moderado de inmunopositividad (++) entre veinticinco y cincuenta células por campo, inmunopositividad baja (+) con menos de veinticinco células por campo y en ausencia de inmunotinción (-) se considera un grado nulo o inmunonegatividad. Se anexan en el presente trabajo las imágenes mas representativas del estudio. En la fotomicrografía No. 2 a la inspección de microscopia de luz con el objetivo 40 X, se demostró un grado alto de inmunopositividad celular (+++) en la presencia de SON-1 de los ojos glaucomatosos, comparados con los ojos de perros normales (fotomicrografía No. 1). En la retina de los ojos glaucomatosos hubo una distribución de la inmunotinción con DAB uniforme en el citoplasma de la gran mayoría de las células que componen las capas de la retina, en las células ganglionares se apreció una fuerte tinción granular dentro del citoplasma, además de una distribución uniforme en el citoplasma de la glía, de la capa limitante interna, así como de la capa nuclear interna en donde encontramos a las células amacrinas, bipolares, horizontales el componente no neuronal, las células de Müller. En la retina de los ojos normales existió una distribución uniforme también de SON 1 pero con intensidad moderada (++) en la tinción.

En la fotomicrografía 4 con microscopía de luz con el objetivo 40 X, y como complemento del presente estudio, se observó inmunotinción alta de SON 1 en el citoplasma del epitelio no pigmentario del cuerpo ciliar de un ojo glaucomatoso, la manifestación de SON 1 en el citoplasma del epitelio no pigmentario de un ojo normal (Fotomicrografía 3) fue moderada, en donde además hubo un ligero patrón focal de distribución.

En la fotomicrografía 6 bajo microscopía de luz con el objetivo 40 X se apreció una manifestación moderada (++) uniforme de SON 3 en el citoplasma de las células ganglionares, del citoplasma de las células de la capa nuclear interna, así como del citoplasma de los endotelios

vasculares de los ojos glaucomatosos, la inmunotinción fue similar a la manifestación de SON 3 en el citoplasma de las células ganglionares, de la capa nuclear interna y del endotelio vascular de los ojos normales (5).

En la fotomicrografía 8 , en observación bajo microscopía de luz con el objetivo 40 X y complementando el estudio, se observó una manifestación moderada focal (++) de SON 3 dentro del citoplasma del epitelio no pigmentario de una manera focal en los ojos glaucomatosos, sin embargo, no hubo manifestación de SON 3 en el epitelio no pigmentario (-) del cuerpo ciliar de ojos normales (Fotomicrografía 7).

En la fotomicrografía 9 muestra tejido ocular que se observó bajo microscopía de luz con el objetivo 40 X en donde se apreció una expresión leve de la SON 2 dentro de las capas de la retina de un ojo normal de perro. Se observó una manifestación focal de alta intensidad de SON 2 en el citoplasma de la células de la capa nuclear interna, una manifestación intensa de SON 2 en las células ganglionares y células de la glía de los ojos glaucomatosos (Fotomicrografía 10).

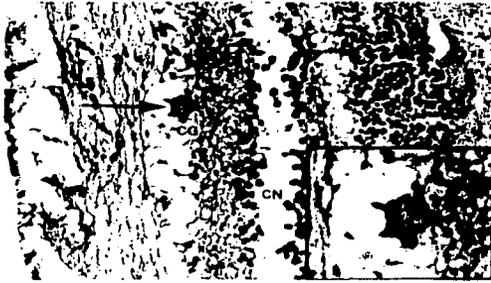
En la fotomicrografía 12 por medio de microscopía de luz con el objetivo 40 X se anexó una imagen de la manifestación de SON 2 en el cuerpo ciliar de ojos glaucomatosos en donde se apreció una intensa inmunotinción en el citoplasma del epitelio no pigmentario, en los ojos normales hubo una presencia moderada y focal de SON 2 dentro del citoplasma del epitelio no pigmentario del cuerpo ciliar (Fotomicrografía 11).

En las fotomicrografías 13 y 14 observadas en microscopía de luz con el objetivo 20 X se aprecia la músculo ciliar del ojo de un perro normal. Se observó una manifestación intensa (+++) de la SON 1 de las células contráctiles que conforman esta red. La siguiente imagen fue del mismo músculo ciliar del ojo de perro sano que no presentó manifestación de la SON 2, respectivamente.

La fotomicrografía 15 se observó en este trabajo bajo microscopía de luz con el objetivo 40 X una imagen en donde se observó el endotelio corneal de un ojo de perro normal, moderadamente inmunopositivo por la manifestación de SON 2, en la siguiente imagen (Fotomicrografía 16) se apreció una manifestación intensa de SON 2 en el citoplasma del endotelio corneal de un ojo de perro glaucomatoso.

Los valores para el análisis de endotelina-1 bajo el método de ELISA en el humor acuoso fue el siguiente, el rango de ET-1 en el humor acuoso fue de 1.12-3.63 pg/mL en perros sanos, y de 1.97-14.97 en perros con glaucoma. El nivel de ET-1 en humor acuoso de perros sanos y perros glaucomatosos (media+/- D.E.) fue de 2.33 +/- 0.90 y 8.11 +/- 5.03 pg/mL respectivamente (Cuadro 2). Una prueba de análisis de varianza de doble vía indicó que esta diferencia fue significativa ($P = 0.0084$). El efecto de la edad en los niveles de ET-1 en humor acuoso no tuvo significancia ($P = 0.6283$). Los parámetros para perros sanos y glaucomatosos se demuestran en los Cuadros 2 y 3 respectivamente. La amplia variabilidad en las concentraciones de ET-1 encontrada en los perros glaucomatosos, se podría explicar por los grados de daño encontrados en la retina y el nervio óptico ($P = 0.0006$). No hubo correlación significativa entre la presión intraocular y los niveles de ET-1 encontradas en los ojos glaucomatosos ($P = 0.29$).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Fotomicrografía 1. Célula ganglionar (CG, flecha) de la retina de un ojo normal de perro que manifiesta inmunotinción elevada granular de SON 1 (recuadro 100 x) dentro de su citoplasma (Microscopía de luz con el objetivo 40 X, tinción con hematoxilina de Hill y DAB)



Fotomicrografía 2. Inmunotinción intensa en la retina de un perro glaucomatoso de la SON 1 dentro de la capa nuclear interna (CN) y en las células ganglionares (CG) (Microscopía de luz con el objetivo 40 X, tinción con hematoxilina de Hill y DAB).

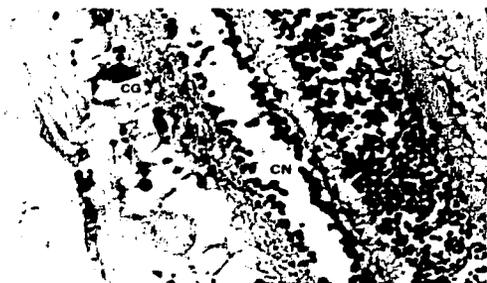


Fotomicrografía 3. Inmunotinción moderada de la SON 1 en el epitelio no pigmentario del cuerpo ciliar del ojo de perro normal (ENP) (Microscopía de luz con el objetivo 40 X tinción con hematoxilina de Hill y DAB).



Fotomicrografía 4. La inmunotinción de SON 1 es alta (+++) en el epitelio no pigmentario (ENP) del ojo glaucomatoso (Microscopía de luz con el objetivo 40 X tinción con hematoxilina de Hill y DAB).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



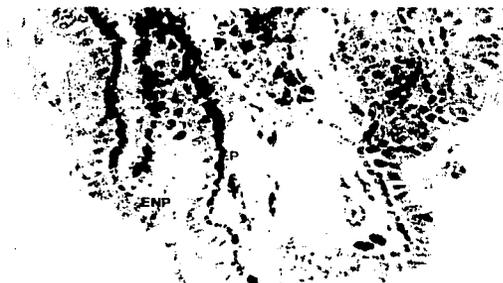
Fotomicrografía 5. Inmunotinción moderada de SON 3 en las células ganglionares (CG), así como en la capa nuclear interna (CN) de un ojo de perro normal. (Microscopía de luz con el objetivo 40 X tinción con hematoxilina de Hill y DAB).



Fotomicrografía 6. La inmunotinción moderada de SON 3 en el ojo de perro glaucomatoso en las células ganglionares (CG) y en las de la capa nuclear interna (CN). (Microscopía de luz con el objetivo 40 X tinción con hematoxilina de Hill y DAB).



Fotomicrografía 7. Inmunotinción negativa (-) de SON 3 dentro del epitelio pigmentario del cuerpo ciliar del ojo de un perro normal (Microscopía de luz con el objetivo 40 X tinción con hematoxilina de Hill y DAB).

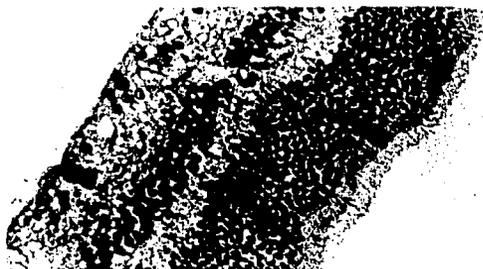


Fotomicrografía 8. Inmunotinción moderada focal de SON 3 dentro del citoplasma del epitelio pigmentario. (Microscopía de luz con el objetivo 40 X tinción con hematoxilina de Hill y DAB).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Fotomicrografía 9. Leve inmunotinción (+) de SON 2 dentro de las capas de la retina (CG, CN) de un ojo de perro normal (Microscopía de luz con el objetivo 40 X tinción con hematoxilina de Hill y DAB).



Fotomicrografía 10. Inmunotinción alta en las capas de la retina de un ojo de perro glaucomatoso (Microscopía de luz con el objetivo 40 X tinción con hematoxilina de Hill y DAB).

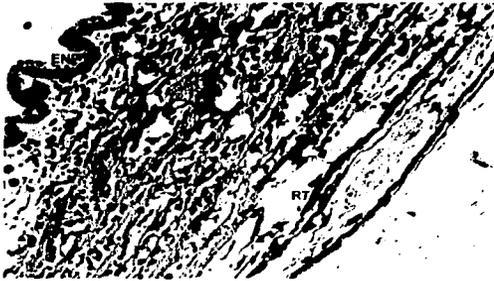


Fotomicrografía 11. Cuerpo ciliar del ojo de un perro normal con inmunotinción moderada y focal de SON 2 en epitelio no pigmentario (ENP) (Microscopía de luz con el objetivo 40 X, tinción con hematoxilina de Hill y DAB).

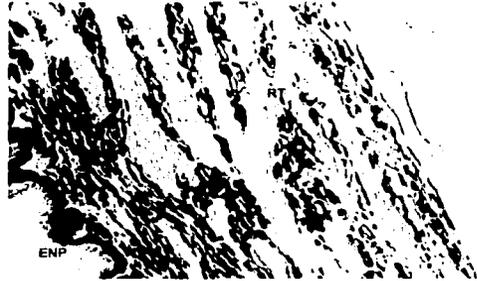


Fotomicrografía 12. Inmunotinción alta (+++) uniforme de SON 2 en el epitelio no pigmentario (ENP) del ojo de perro glaucomatoso. (Microscopía de luz con el objetivo 40 X, tinción con hematoxilina de Hill y DAB).

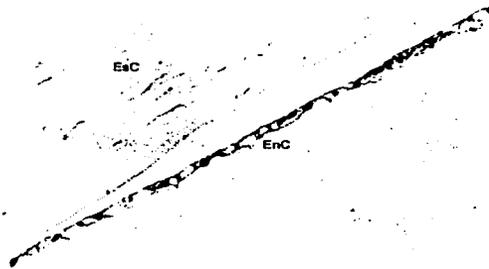
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



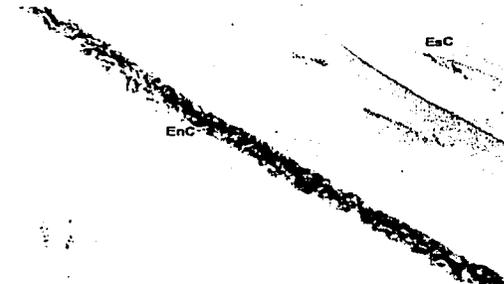
Fotomicrografía 13. Inmunotinción intensa (+++) de SON 1 de las células del músculo ciliar de un ojo de perro normal (Microscopía de luz con el objetivo 20 X, tinción con hematoxilina de Hill y DAB).



Microfotografía 14. Nula inmunotinción (-) de SON 2 en las células de del músculo ciliar de un ojo de perro normal (Microscopía de luz con el objetivo 20 X, tinción con hematoxilina de Hill y DAB).



Fotomicrografía 15. Endotelio corneal (EnC) con moderada inmunotinción (++) de SON 2 en un ojo de perro normal (Microscopía de luz a 40 X, tinción con hematoxilina de Hill y DAB).



Fotomicrografía 16. Endotelio corneal (EnC) del ojo glaucomatoso en donde existe una fuerte inmunotinción (+++) de SON 2, EsC estroma corneal. (Microscopía de luz con el objetivo 40 X, tinción con hematoxilina de Hill y DAB).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CUADRO 2. Parámetros de perros normales antes de la cirugía, incluyendo los niveles de ET-1 en humor acuoso.

Raza	Edad	Presión intraocular	ET-1 (pg/mL)
Mestizo	Adulto	16	1.12
Mestizo	Adulto joven	16	2.17
Mestizo	Adulto joven	16	2.56
Mestizo	Adulto	16	3.63
Mestizo	Adulto joven	16	2.15

ET-1: Endotelina 1, adulto joven: 1 a 3 años., adulto: 3 a 7 años.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 3. Parámetros de perros glaucomatosos antes de la cirugía, incluyendo los niveles de ET-1 en humor acuoso.

Raza	Edad	Presión intraocular	Estadio de la enfermedad	Gonioscopia	Apariencia del fondo	ET-1 (pg/mL)
Mestizo	9	48	Crónico	Cerrado	Atrofia de retina y vasos	9.1
Mestizo	9	40	Crónico	Cerrado	Atrofia de retina y vasos	8.08
Mestizo	6	45	Crónico	Cerrado	Atrofia de retina y vasos	14.97
Bouvier de Flandres	3	42	Agudo	Estrecho a Cerrado	Excavación de C. N.O.	1.97
Huskie Siberiano.	7	38	Crónico	Cerrado	Atrofia de retina y vasos	13.45
Huskie Siberiano	2	32	Crónico	Estrecho a Cerrado	Excavación de C. N.O.	4.14
Mestizo	9	45	Crónico	Disgénico	C.N.O. Pálida	2.17
Pastor Alemán	7	42	Crónico	Disgénico	Atrofia de retina y vasos	2.76
Beagle	11	65	Crónico	#	#	12.71
Dálmata	8	54	Crónico	#	#	11.7

Invisible a causa de edema corneal
C.N.O. Cabeza de nervio óptico

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DISCUSIÓN

El glaucoma en los perros tiene una fase normotensa progresiva subclínica, seguido de una fase tardía hipertensiva. La deformación escleral mecánica, ocurre en etapas muy tempranas, antes del desarrollo de los signos clínicos (15,76). La neuropatía glaucomatosa ha sido observada en humanos, independiente del aumento de la presión intraocular (16). Hay evidencia de que la malla trabecular de ojos humanos tiene elementos contráctiles intrínsecos que pueden ser relajados por ON y contraídos por ET-1. Se ha sugerido que ON está involucrado en el incremento de la eliminación del humor acuoso y reducir la PIO, mientras que endotelina-1 (ET-1) incrementa la PIO (46). El flujo sanguíneo de la cabeza del nervio óptico puede estar involucrado en la patogénesis del glaucoma por pérdida de la autorregulación de los vasos que nutren a la retina y a la cabeza del nervio óptico (16). Las células endoteliales participan activamente en la regulación del tono vascular a nivel de la microcirculación cerebral, los productos para este control son el ON y la ET-1 (79). Al parecer ON y ET-1 no son moduladores principales de la PIO, pero podrían estar involucrados de manera directa en la falla circulatoria de pacientes con glaucoma normotenso, al generar un incremento en la vasoconstricción, y un decremento de ON en la respuesta vasodilatadora local (39,57,58,59,60). Defectos en el fenómeno de autorregulación y disfunción microcirculatoria de los vasos del ojo del perro, pueden resultar en una lesión isquémica a la retina y al nervio óptico bajo condiciones normotensivas e hipertensivas, favoreciendo la liberación de endotelina-1, acumulación de glutamato y activación de sintasas del óxido nítrico (77). Los resultados de este estudio demuestran elevados niveles de endotelina-1 y alteraciones en los patrones de distribución de las isoformas de la sintasa del óxido nítrico 1, 2 y 3 de los ojos glaucomatosos de los perros. En el glaucoma primario de los humanos, las isoformas del óxido nítrico están aparentemente en altas cantidades dentro de la retina. La SON 1 en este experimento se expresa de forma intensa en el citoplasma de las células de la glía, células ganglionares, y células de la capa nuclear interna de la retina de ojos glaucomatosos, de manera leve también hay expresión en la retina de los ojos normales, lo que podría ser un indicativo de la función neurotransmisora durante procesos fisiológicos normales, sin embargo, su sobreexpresión durante el glaucoma exagera su potencial tóxico, por lo que confirma su

actividad en el proceso del glaucoma de tipo neurodegenerativo y oxidativo. Estos datos concuerdan con los encontrados por Neufeld *et al.* que valoraron la cabeza del nervio óptico y la región prelaminar para ello utilizó ojos normales y glaucomatosos de seres humanos. Shakeel *et al.* observaron una expresión moderada de SON 1 en los ojos de ratas hipertensos; estas observaciones son similares a las realizadas por Perez *et al.* en las células amacrinas, ganglionares, bipolares de retinas de ratas (78). Sin embargo contrastan con las observaciones de Nathanson y Mckee que informaron una pobre manifestación de SON 1 en la red trabecular de ojos humanos glaucomatosos (3)

La SON 3 se manifiesta en este experimento con mayor intensidad en las células de la retina de ojos glaucomatosos que en los ojos normales, el patrón de marcaje es difuso en las células de las retinas de ojos normales, lo cual es similar a los resultados obtenidos por Shakeel *et al.* En estas observaciones se aprecia una distribución homogénea entre las SON 1 y la SON 3 de los ojos glaucomatosos con respecto a los ojos normales dentro de la retina, en otros estudios se ha observado que las isoformas purificadas y clonadas de células endoteliales son también expresadas en neuronas (80). Bajo condiciones patológicas la SON 2 puede ser inducida en la mayoría de los tejidos de los organismos, incluyendo neuronas, astrocitos y células endoteliales (47,51,52). La SON 2 es inducible solo bajo condiciones patológicas por endotoxinas, inflamación y algunas citocinas tales como la interleucina-1 (IL-1), IL-6, TNF (factor de necrosis tumoral), una vez inducida la SON 2 producirá óxido nítrico en altas cantidades y por periodos prolongados, favoreciendo la elaboración de peroxinitritos y radicales libres del oxígeno (34,35). Cuando la SON 2 está presente en el SNC está altamente relacionada con neurotoxicidad. La aparición de la SON 2 o inducible en este estudio dentro de las células ganglionares, amacrinas y glía de los ojos glaucomatosos es sugerente de neurodegeneración, las observaciones de la SON 2 son similares a las encontradas en la cabeza del nervio óptico de ojos humanos glaucomatosos (53). Sin embargo contrastan con las observaciones hechas por Shareef *et al.* en ojos normales de ratas en donde no hubo expresión de la SON 2 (48). En otro estudio se logró detectar la presencia creciente de SON 2 en un cultivo celular de astrocitos conforme a se aumentaba presión hidrostática *in vitro* (12). Neufeld *et al.* demostraron que el uso crónico de aminoguanidina, un inhibidor de la SON 2, mejora la supervivencia

de células ganglionares de la retina de ratas (49). Koeberle *et al.* demostraron la expresión de SON 2 en células de Müller y neuroglía, después de haber sido seccionados los axones del nervio óptico en ojos de ratas normales, también ponderó el uso de inhibidores de SON para favorecer la sobrevivencia de los axones de las células ganglionares (42).

En el presente estudio se demostró que los ojos glaucomatosos contienen niveles más elevados de ET-1 que los ojos de perros normales, no hay indicación en esta información de que el incremento de ET-1 sea la causa de los incrementos de la presión intraocular o solo sea un evento secundario. El incremento de la endotelina 1 puede ser secundario a la liberación de aminoácidos excitotóxicos, a la isquemia, la reperfusión y la inflamación o a un daño de las células endoteliales (67,68,69,70). La rápida degeneración de la cabeza del nervio óptico encontrada en el glaucoma de los perros, a pesar de una agresiva terapia para reducir la PIO elevada, podría deberse al efecto crónico de ET-1, isquemia vascular y liberación de glutamato (72). Diferencias ultraestructurales en los capilares de la lámina cribosa, anomalías de la circulación de la retina e irregularidades del flujo sanguíneo ha sido observado en perros con glaucoma hereditario, antes de los incrementos de la presión intraocular. Por lo tanto, un problema de la microcirculación podría estar relacionado con la endotelina 1, por lo que conforme se avance en un mejor entendimiento de la neurofarmacología y biología celular de los daños y forma de reparación del sistema visual, indefectiblemente refinaremos nuestros conceptos de neuropatía óptica glaucomatosa en los perros, por lo que los diseños terapéuticos serán dirigidos a tratar la causa principal, así como a reparar y proteger el nervio óptico (81).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CONCLUSIONES

1. Las sintasas del óxido nítrico (SON) 1, 2 y 3 se manifiestan en las células ganglionares y células de la capa nuclear interna de los perros, lo que representan moléculas relacionadas con el proceso fisiológico visual.
2. De manera más intensa las sintasas del óxido nítrico 1, 2 y 3 se manifiestan en las retinas de los ojos de perros glaucomatosos con respecto a los ojos de perros normales, lo que puede significar un papel determinante en el proceso neurotóxico.
3. Las altas concentraciones de óxido nítrico (ON) y endotelina 1 (ET1) en los ojos de perros glaucomatosos podrían estar relacionadas en el proceso de déficit autorregulatorio vascular y neurodegenerativo y del glaucoma primario en los perros.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

1. Cottrell BD and Barnett KC.Primary glaucoma in the Welsh Springer Spaniel. *J Small Anim Pract* 1988;29: 185-199.
2. García-Sánchez GA.Evaluación de gonioimplantes valvulares y no valvulares para el control a largo plazo del glaucoma canino. Tesis doctorado.UNAM. 1998.
3. Nathanson JA and Mckee M.Alterations of ocular nitric oxide synthase in human glaucoma. *Invest Ophthalmol Visual Sc.*1995;36:1774-1784.
4. Sharir M and Zimmerman TJ.Initial treatment of glaucoma: surgery or medications. II. Medical therapy. *Surv Ophthalmol* 1993;37: 299-304.
5. Chew SJ and Ritch R.Second annual optic nerve rescue and restoration think tank meeting. *Journal of Glaucoma.*5(2)1996;147-149.
6. Lovekin LG and Bellhorn RW.Clinicopathologic Changes in Primary Glaucoma in the Cocker Spaniel. *Am J Vet Res* 1968;29. 368;379.
7. Levin LA.Relevance of the Site of Injury of Glaucoma to Neuroprotective Strategies. *Surv Ophthalmol* 2001;3: 243-249.
8. Nickells RW.Retinal ganglion cell death in Glaucoma: the how, the why and the maybe. *J of Glaucoma* 1996;5:345-356.
9. Gelatt KN.Veterinary Ophthalmology. 2nd. Ed. Lea and Febiger, Philadelphia, 1990.
10. Mansour-Robaey S, Clarke DB, Wang YC, et al.Effects of ocular injury and administration of brain derived neurotrophic factor on survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91: 1632-1636.

11. Martin CL. Glaucoma. AAHA's 48th Annual Meeting *Proc* 1981;301-303.
12. Liu B, Neufeld AH. Nitric oxide synthase-2 in human optic nerve head astrocytes induced by elevated pressure in vitro. *Arch Ophthalmol* 2001;119:240-5.
13. Brooks DE and Dziezyc J. The canine glaucomas: pathogenesis, diagnosis and treatment. *Compend Contin Educ Pract Vet* 1983;5:292-301.
14. Björn E and Narfström K. Correlation of morphologic features of the iridocorneal angle to intraocular pressure in Samoyeds. *Am J Vet Res* 1991;62:1875-1878.
15. Brooks DE, Komaromy AM, Källberg ME. Comparative optic nerve physiology: Implications for glaucoma, neuroprotection, and neurodegeneration. *Vet Ophthalmol* .1999;2: 13-25.
16. Fechtner RD, Weinreb RN. Mechanisms of optic nerve damage in primary open angle glaucoma. *Surv Ophthalmol*. 1994;39:32-47.
17. Proulx J, Dhupa N. Severe Brain Injury. *Compend Contin Educ Pract Vet* 1998;20: 897-905.
18. Sugar HS. Pitfalls in the medical treatment of simple glaucoma. *Annals of Ophthalmol* 1979;7:1041-1050.
19. Savill, JS *et al*. Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophils lead to its recognition by macrophages. *J. Clin. Invest* 1989;83: 849-865.
20. Schwartzman RA and Cidlowski JA. Apoptosis the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocrine Rev* 1999;14:133-143.
21. Bedford PGC. Gonioscopy in the dog. *J. Small Anim Pract* 1977;18:615-629.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

22. Schwartz M, Belkin M, Yoles E and Solomon A. Potential treatment modalities for glaucomatous neuropathy: Neuroprotection and Neuroregeneration. *J Glaucoma* 1996;5: 427-432.
23. Adachi K, Kashii S, Masai H, Veda M, Morizane C, Kenadek K, Kume T, Akaike A and Honda Y. Mechanism of pathogenesis of glutamate neurotoxicity in retinal ischemia. *Graefes Arch for Clin and Exp Ophthalmol* 1998;236:766-774.
24. Osborne NN, Ugarte M, Chao M, Chidlow G, Bae JH, Wood JP, Nash MS. Neuroprotection in relation to retinal ischemia and relevance to glaucoma. *Surv Ophthalmol* 1999;43:102-128.
25. Tatton WG, Chalmers-Redman RM, Tatton NA. Apoptosis and antiapoptosis signaling in glaucomatous retinopathy. *Eur J Ophthalmol* 2001;11:12-22.
26. Nickells RW. Apoptosis of retinal ganglion cells in glaucoma: an update of the molecular pathways involved in cell death. *Surv Ophthalmol* 1999; 43:151-161.
27. Cohen JJ. Apoptosis. *Immunol Today* 1993;14:16-26.
28. Samuelson, D.A. and Kirk, N.G. Aqueous outflow in the beagle. II. Postnatal morphologic development of the iridocorneal angle: corneoscleral trabecular meshwork and angular aqueous plexus. *Current Eye Res* 1984; 3:795-807.
29. Franco-Bourland RE, Guízar-Sahagún F, García-Sánchez, GA, Morales-Odor A, Alvarez A, Esquivel F. and Rodriguez S. Retinal vulnerability to glutamate excitotoxicity in canine glaucoma: Induction of neuronal nitric oxide synthase in retinal ganglion cells. *Proc West Pharmacol Soc* 1998;41:74-81.
30. Piccolo MG. Excitotoxicity and neuroprotection in glaucoma. American Optometric Association 1997.

ESTA TESIS CON
DE LA FALTA DE ORIGEN

31. Vermes I, Haanan C. Apoptosis and programmed cell death in health and disease. *Adv Clin Chem* 1994; 31:161-177.
32. DeMeester S et al. Nitric oxide and inhibits stress-induced endothelial cell apoptosis. *Crit Care Med* 1998;26: 1500-1509.
33. Michael T, Feron O. Nitric oxide synthases: which, where, how, and why. *J Clin Invest* 1997;100:2146-2152
34. Chiou GC. Review: effects of nitric oxide on eye disease and their treatment. *J Ocul Pharmacol Ther* 2001;17:189-198.
35. Yuan L, Neufeld AH. Tumor necrosis factor-alpha: a potentially neurodestructive cytokine produced by glia in the human glaucomatous optic nerve head. *Glia* 2000;32:42-50.
36. Huang PL, Fishman MC. Genetics analysis of nitric oxide synthase isoforms: targeted mutation in mice. *J Mol Med* 1996;74:415-421
37. Mathews CK, van Holde KE. Metabolismo de los productos nitrogenados.. *Bioquímica*, 2ª ed. 1996: 815-865
38. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 1996;271:1424-1437.
39. Haefliger IO, Flammer J. Nitric oxide and Endothelin in the pathogenesis of Glaucoma. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia. 1998.
40. Schmidt HHHW, Pollock JS, Nakane M, Gorsky LD, Förstermann U and Murad F. Purification of a soluble isoform of guanylyl cyclase-activating-factor synthase. *Pro. Natl Acad Sci USA* 1991;88:365-369.
41. Huie RE, Padmaja K. The reaction of NO with superoxide. *Free Radical Res Com* 1993; 18:195-9.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

42. Koeberle PD, Ball AK. Nitric oxide synthase inhibition delays axonal degeneration and promotes the survival of axotomized retinal ganglion cells. *Exp Neurol* 1999;158:366-381.
43. Weinreb RN, Levin LA. Is Neuroprotection a Viable Therapy for Glaucoma? *Arch Ophthalmol* 1999;117:1540-1544.
44. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43:109-42.
45. Morgan JE, Caprioli J, Koseki Y. Nitric oxide mediates excitotoxic and damage in rat retinal ganglion cells cocultured with astroglia. *Arch Ophthalmol* 1999; 117:1524-1529.
46. Nathanson JA, Mckee M. Identification of an extensive system of nitric oxide- producing cells in the ciliary muscle and outflow pathway of the human eye. *Invest Ophthalmol Visual Sc* 1995;36:1765-1773.
47. Morgan JE. Optic nerve head structure in glaucoma: astrocytes as mediators of axonal damage. *Eye* 2000;14:437-44.
48. Shareef S, Sawada A, Neufeld AH. Isoforms of nitric oxide synthase in the optic nerves of rat eyes with chronic moderately elevated intraocular pressure. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40:2884-2891.
49. Neufeld AH, Sawada A, Becker B. Inhibition of nitric-oxide synthase by aminoguanidine provides neuroprotection of retinal ganglion cells in a rat model of chronic glaucoma. *Pharmacol* 1999; 96:9944-9948.
50. Kiel JW, Reitsamer HA, Walker JS, Kiel FW. Effects of nitric oxide synthase inhibition on ciliary blood flow, aqueous production and intraocular pressure. *Exp Eye Res* 2001;73:355-364.
51. Nathan C, Xie QW. Nitric oxide synthases: roles, tolls and controls. *Cell* 1994;78:915-918.

52. Wallace MN, Bisland SK. NADPH-diaphorase activity in activated astrocytes represents inducible nitric oxide synthase. *Neuroscience* 1994;59:905-919.
53. Neufeld AH, Hernandez MR, Gonzalez M. Nitric oxide synthase in the human glaucomatous optic nerve head. *Arch Ophthalmol* 1997;115:497-503.
54. Nathan C. Inducible nitric oxide synthase: what difference does make. *J Clin Invest* 1997;100: 2417-2423
55. Morgan JE. Optic nerve head structure in glaucoma: astrocytes as mediators of axonal damage. *Eye* 2000;14:437-444.
56. Vorwerk CK, Lipton SA, Zurakowski D, Hyman BT, Sabel BA, Dreyer EB. Chronic low-dose glutamate is toxic to retinal ganglion cells. *Invest Ophthalmol Vis Sc* 1996; 37:1618-1624.
57. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsubishi Y *et al.* A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1998;332:411-415.
58. Gelatt KN, Gelatt JP. Handbook of small animal Ophthalmology surgery. Vol. 2. Corneal and intraocular procedures. Pergamon Press. Tarrytown, NY. 1995:146-156.
59. Kallberg ME, Brooks DE, García-Sánchez GA, Komaromy AM, Szabo NJ. Endothelin 1 levels in the aqueous humor of dogs with glaucoma. *J Glaucoma* 2002; 11:105-109.
60. Brooks DE, García-Sánchez GA, Dreyer EB, Zurakowski D, Franco-Bourland RE. Vitreous body glutamate concentration in dogs with glaucoma. *Am J Vet Res* 1997; 58:864-867.
61. Gumm GG, Gelatt KN, Ofri R. Physiology of the eye. In, Gelatt KN (ed) : *Veterinary ophthalmology*. Lippincott Williams and Williams, 1999; 3: 162-171.

62. Kimura C, Itoh Y, Ohkubo S. et al. Cloning and sequencing of a canine gene segment encoding mature endothelin. *Nucleic Acids Res* 1989; 17:3211-3290.
63. Tezel G, Kass MA, Kolker AE, et al. Plasma and aqueous endothelin levels in primary open angle glaucoma. *J Glaucoma* 1997; 6:83-89.
64. Naskar R, Dreyer EB. New Horizons in Neuroprotection. *Surv Ophthalmol* 2001;45:3.250-254.
65. Noske W, Hensen J, Wiederholt, M. Endothelin-like immunoreactivity in aqueous humor of patients with primary open angle glaucoma and cataract. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1997;235:551-552.
66. Baumgartner BJ, Shine HD. Permanent rescue of lesioned neonatal motoneurons and enhanced axonal regeneration by adenovirus-mediated expression of glial cell-line-derived neurotrophic factor. *J Neurosci Res* 1998;54:766-777.
67. Sugiyama T, Moriya S, Oku H et al. Association of endothelin-1 with normal tension glaucoma: clinical and fundamental studies. *Surv Ophthalmol* 1995;39:49-56.
68. Brooks DE, Samuelson DA, Gelatt KN, Smith PJ. Morphologic changes in the lamina cribosa of beagles with Primary Open – Glaucoma. *Am J Vet Res* 1989;50:936-941.
69. Okada M, Yamashita C, Okada K. Contribution of endothelin-1 to warm ischemia/reperfusion of the rat lung. *Am J Respir Crit Care* 1995;152:2105-2110.
70. Kawumara E, Yamkana N, Okamoto E, Tomoda F, Furukawa K. Response of plasma and tissue endothelin-1 to liver ischemia and its implication in ischemia-reperfusion injury. *Hepatology* 1995;21:1138-1143.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

71. Oku H, Sugyama T, Kojima S. *et al*. Experimental optic cup enlargement caused by endothelin -1 induced chronic optic nerve head ischemia. *Surv Ophthalmol* 1999; 44:74-84.
72. Gelatt KN, Brooks DE. The canine glaucomas. In : Gelatt KN, ed. *Veterinary Ophthalmology*. Philadelphia, PA: Lippincott Williams and Wilkins, Baltimore. Third edition: 1999, 701-754
73. Liu B, Neufeld AH. Nitric oxide synthase-2 in human optic nerve head astrocytes induced by elevated pressure in vitro. *Arch Ophthalmol* 2001; 119:240-245.
74. Guesdon JL, Ternynck T, Avrameas S. The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. *J Histochem Cytochem* 1979; 27:1121-1131,.
75. Hsu SM, Raine I, Fanger H. Use of avidin and biotin in immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem* 1981; 29: 577-580
76. Brooks DE, Komaromy AM, Kallberg M.E. Comparative retinal ganglion cell and optic nerve morphology. *Vet Ophthalmol* 1999; 2:3-12.
77. Kim TW, Kang KB, Choung HK *et al*. Elevated glutamate levels in the vitreous body of an in vivo model of optic nerve ischemia. *Arch Ophthalmol* 2000; 118:533-536.
78. Perez MT, Larsson B, Alm P, Andersson KE, Ehinger B. Localization of neuronal nitric oxide synthase-immunoreactivity in rat and rabbit retinas. *Exp Brain Res* 1995; 104.
79. Spatz M, Chen Y, Ohara Y, McCarron RM. Brain Microvasculature: Evidence for Interactive Endothelial-Dependent Responses Induced by Endothelin-1 and Nitric Oxide. <http://www.ms-fund.keio.ac.jp/discussion/spatz.htm>
80. Dinerman JL, Dawson TM, Schell MJ, Snowman A, and Snyder SH. Endothelial nitric oxide synthase localized to hippocampal

pyramidal cells: implications for synaptic plasticity. *Proc Natl Acad. Sci USA* 1994;9: 4214-4218.

81. Shatz CJ, O'leary DDM. Repair and replacement to restore sight. *Arch Ophthalmol* 1993;11:472-477.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN