

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

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

**ANÁLISIS DE LOS PATRONES DE EXPRESIÓN  
DEL FACTOR NEUROTRÓFICO DERIVADO DEL  
CEREBRO Y DE SUS RECEPTORES TRKB Y P75  
EN LA RETINA DE PERROS NORMALES Y  
GLAUCOMATOSOS**

TESIS

**PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA

**SIMONE IWABE**

TUTOR: DR. FRANCISCO TRIGO TAVERA

COMITE TUTORAL: DR. GUSTAVO ADOLFO GARCIA SANCHEZ

DRA. NORMA MORENO MENDOZA



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## DEDICATORIA

### **A mis padres**

Les dedico esta tesis por todo el apoyo y la confianza en mí, por el amor incondicional que me dedicaron, por siempre creyeren mucho en mí y en mi capacidad, por ayudar a alcanzar mis metas y mis sueños. Los amo mucho.

### **A mi hermanita Cristina:**

Aunque la distancia, el tiempo y los obstáculos están presentes entre nosotras, este logro también es para ti. Te amo mucho.

### **A mis hermanitas Carol, Acácia y Leticia:**

Aunque se encuentren lejos saben que las tengo muy cerca a mi lado y en mi corazón, gracias por el apoyo incondicional en todos los momentos, y por que son parte de mi vida. Las amo mucho.

### **A mis amigos:**

**Amiguita y hermanita Asse:** no tengo como agradecer tu complicidad en momentos tan importantes en mi vida principalmente en estos últimos años, tu amistad y tu cariño son únicos. Te quiero muchísimo.

**Paco:** como agradecer todo tu apoyo, amistad, cariño y principalmente paciencia con TODAS mis nenitas?!?!?! Te quiero un montón.

**Amiguita Sandy:** gracias por todo tu apoyo, preocupación, cariño y amistad. Te quiero mucho. Ah y por supuesto gracias al cariño de mis nenes Marifer y Emilio, sin olvidar a Lalo.

**Ana, mi sobrinito Alex y Marco:** amiguita gracias por tu amistad y compartir momentos importantes para mi. Gracias por el cariño de todos ustedes. Los quiero mucho.

**OFM,** muchas gracias por TODA la ayuda siempre que la necesité, pero principalmente por ser mi amigo tan querido y especial. Te quiero mucho. DEMB.

**Diana, Laura, Angel, Flaco, Alexa, Nils, Cuñis, Alex Jimenez, Alex Rivera, Fred, Carlos, Emiliano, Juanjo, Alex Garcia, Paulo:** mil gracias por que son parte importante en mi vida y por estar cerca en un momento muy especial para mi, gracias por todo el cariño y apoyo. Los quiero muchísimo.

**Gabi Eleggua:** aunque llegaste hace poco tiempo en mi vida, ya eres parte muy importante de ella. Gracias por TODO, pero de verdad por TODO el apoyo, por tu amistad y cariño. Te quiero mucho.

**Renato, Andrea, Tano y Renata:** porque ya son mi familia, mil gracias por todo el cariño, apoyo, por confiaren y creyeren en mí. Los quiero mucho.

Valeria, Eli, Rocio y Carolina: **muchas gracias niñas por todo el apoyo y la amistad.**

A TODOS MIS AMIGOS QUE ME APOYARON EN MOMENTOS TAN IMPORTANTES. GRACIAS.

Y PRINCIPALMENTE A TODOS LOS ANIMALITOS QUE HICIERON POSIBLE LA REALIZACIÓN DE ESTA TESIS. MUCHAS GRACIAS.

## AGRADECIMIENTOS

**A mi tutor Dr. Francisco Trigo Tavera**, por confiar en mí y por todo el apoyo.

**A mi tutora Dra. Norma Moreno Mendoza**, por siempre creer en mí y ser más que una tutora, ser una amiga.

**A mi comité tutorial y mi jurado:**

**Dr. Gustavo Adolfo García Sánchez, Dr. Felix Gil Carrasco, Dr. Enrique**

**Aburto Fernandez, Dra. Rosa Maria Vigueras Villaseñor, y Dr. Gabriel**

**Guizar Sahagún**, gracias por la ayuda, pues sus puntos de vista enriquecieron el presente trabajo.

**Al Dr. Carlos Vasquez Pelaez**, por su gran ayuda con el análisis estadístico y discusión de este trabajo.

**A la Dra. Socorro Lara Díaz**, por toda la ayuda, apoyo y paciencia con tantos papeles para firmar.

**Al Dr. Abelardo A. Rodriguez Reyes jefe del departamento de patología oftálmica de la Asociación Para Evitar la Ceguera en México**, por ser siempre tan dispuesto en ayudarme con las dudas.

**A Sr. Luis Antonio Morales Arreola técnico encargado de histopatología del departamento de patología**, por el apoyo para realizar parte de este trabajo.

**A Angélica Dorantes**, por la gran ayuda con todos los trámites de la beca de DGEP.

**A la Federación Canófila Mexicana**, por seguir apoyándome para la realización de este trabajo.

**A PAPITT**, por el apoyo financiero para la realización de la parte experimental de este trabajo.

## ÍNDICE

I – RESUMEN	ii
II – ABSTRACT	iii
III – INTRODUCCIÓN	1
1. Glaucoma	1
1.1 Patogénesis	1
1.2 Causas de glaucoma	3
1.3 Clasificación	3
1.3.1 Glaucoma primario	3
1.3.2 Glaucoma secundario y congénito	5
1.4 Signos clínicos	5
1.5 Diagnóstico	6
2. Lámina cribosa y glaucoma	6
3. Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (FNDC)	8
4. Receptor Tirocinasa Tipo B y receptor p75	9
5. Interacción neurotrófina FNDC y receptores TrkB y p75	11
IV – JUSTIFICACIÓN	13
V – HIPÓTESIS	13
VI – OBJETIVOS	14
VII – MATERIAL Y MÉTODOS	15
1. Localización	15
2. Animales experimentales	15
3. Examen clínico de los animales	15
4. Obtención de las muestras	16
5. Inmunofluorescencia	16
6. Doble Inmunofluorescencia	17
7. Inmunofluorescencia “in toto” del Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro	18
8. Doble inmunofluorescencia “in toto” de los receptores TrkB y p75	19
9. Extracción y cuantificación del RNAm	19
10. Oligonucleótidos y sonda	20
11. RT – PCR de Tiempo Real (Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction)	21
12. Grupo control	22

13. Análisis estadístico	23
VIII – RESULTADOS	24
1. Inmunofluorescencia	24
2. Inmunofluorescencia “in toto”	27
3. RT-PCR de Tiempo Real	34
IX – DISCUSIÓN	38
1. Inmunofluorescencia	38
2. RT-PCR de Tiempo Real	41
3. Neuroprotección	43
X – CONCLUSIÓN	45
XI – ANEXOS	46
Xii – REFERENCIAS	47

## I – RESUMEN

El glaucoma canino es una neuropatía de la cabeza del nervio óptico donde existe pérdida de las células ganglionares de la retina (CGR). Aún cuando se logre la disminución de la presión intraocular (PIO) la degeneración progresiva de la cabeza del nervio óptico (CNO) y deterioro de la visión del animal son evidencias clásicas de que existen otros factores no relacionados con la PIO que median la evolución de la neuropatía óptica glaucomatosa. El Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (FNDC) es la neurotrofina responsable del desarrollo, mantenimiento y supervivencia de la neurona. En la retina, el FNDC también ayuda en la reparación de las células ganglionares posteriormente a un daño severo. Estos hallazgos sugieren la hipótesis de que la elevación de la PIO induce obstrucción del transporte axonal a nivel de la cabeza del nervio óptico inhibiendo el transporte retrógrado de neurotrofinas a las CGR. Este es el caso del Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro, cuya obstrucción en su transporte conduce a la muerte celular. Con base en estos antecedentes, el propósito del presente trabajo fue determinar el patrón de expresión del FNDC, así como de sus receptores TrkB y p75 en retinas de perros normales y glaucomatosos. Se utilizaron secciones de retinas congeladas de 9 ojos de perros normales y 6 de ojos glaucomatosos. Por técnicas de inmunofluorescencia se evaluó el patrón de expresión de la proteína del FNDC y sus receptores TrkB y p75. La expresión del RNAm del FNDC fue estimada por medio de RT-PCR de Tiempo Real con el método de fluorescencia Taqman, en la que se utilizaron un total de 20 ojos de perros normales. La inmunofluorescencia reveló la presencia del FNDC y sus receptores TrkB y p75 en el citoplasma de las células ganglionares de la retina en ojos normales y glaucomatosos. El FNDC se detectó en la capa de células ganglionares de la retina, en la capa de fibras nerviosas, capa de fotorreceptores, capa nuclear externa, capa plexiforme externa y cabeza del nervio óptico. Los receptores TrkB y el p75 se observaron en la capa de células ganglionares de la retina, capa de fibras nerviosas y en la capa plexiforme interna. La expresión del RNAm del FNDC fue detectada y cuantificada en la retina dorsal, retina ventral y vítreo; no obstante ninguna expresión fue detectada en el cuerpo ciliar. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la expresión del RNAm del FNDC entre las diferentes regiones del ojo  $P > 0.1622$ , tampoco entre el ojo izquierdo y derecho  $P > 0.2897$ . La presencia del RNAm del FNDC en el vítreo sugiere que este podría estar actuando como un transportador en el mecanismo paracrino/autocrino de las neurotrofinas a las células ganglionares de la retina.



## II – ABSTRACT

Canine glaucoma is a neuropathy where there is retinal ganglion cells lost. Despite the fact that it is possible to lower intraocular pressure, progressive optic nerve head degeneration and vision lost is a classical evidence that there are other factors no related with intraocular pressure that mediate glaucomatous optic neuropathy. Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) is the neurotrophin responsible for neuron development, maintenance and survival. In retina BDNF also helps in ganglion cells repair after a severe damage. These findings suggest the hypothesis that intraocular pressure elevation induces axonal transport obstruction at optic nerve head level inhibiting neurotrophins retrograde transportation to RGC. This is the case of Brain Derived Neurotrophic Factor, which transport obstruction can lead to cell death. According to this information, the objective of this present study was to determine the pattern of BDNF expression, as well as its TrkB and p75 receptors in retina from normal and glaucomatous dogs' eyes. Frozen retinal sections from 9 normal and 6 glaucomatous dogs' eyes were used. BDNF and its receptors TrkB and p75 protein expression were evaluated by immunofluorescence technique. BDNF mRNA expression was estimated by quantitative Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) with Taqman fluorescence methodology, using a total of 20 normal dogs' eyes. Immunofluorescence technique detected BDNF and its TrkB and p75 receptors were detected in retina of normal and glaucomatous eyes. BDNF was detected in retinal ganglion cell layer, nerve fiber layer, photoreceptor layer, outer nuclear layer, outer plexiform layer and optic nerve head tissue. TrkB and p75 were detected in retinal ganglion layer, nerve fiber layer and inner plexiform layer. BDNF mRNA expression was detected and quantified in dorsal retina, ventral retina and vitreous; nevertheless no expression was detected in ciliary body. Nor statistical differences were observed in BDNF mRNA expression in the different regions of the eye  $P>0.1622$ , neither between right and left eyes  $P>0.2897$ . The presence of BDNF mRNA in vitreous suggests that it could be acting as a carrier in the paracrine/autocrine mechanism of the neurotrophins to the retina ganglion cells.

### **III – INTRODUCCIÓN**

#### **1. GLAUCOMA**

El glaucoma canino es una neuropatía de la cabeza del nervio óptico donde existe pérdida de las células ganglionares de la retina (CGR) con la progresiva degeneración de la cabeza del nervio óptico (CNO) y deterioro de la visión del animal y finalmente ceguera en los casos no tratados. Estas anomalías en el perro resultan o están asociadas con incremento en la presión intraocular (PIO), lo cual es un factor de riesgo importante que lleva a un daño rápido y progresivo del nervio óptico. La etiología del glaucoma primario probablemente sea multifactorial. Las alteraciones en la cabeza del nervio óptico y la pérdida progresiva de la visión del animal persisten aún cuando se logra la disminución de la presión intraocular (PIO), lo que sugiere que otros factores no relacionados con la PIO en la neuropatía óptica glaucomatosa están relacionados con estos eventos <sup>(1,2,3)</sup>.

#### **1.1 PATOGÉNESIS**

La PIO normal de un perro es variable, sin embargo en términos generales se considera en un promedio de  $16.8 \pm 4.0$  mmHg <sup>(4,5)</sup>. La patogénesis del glaucoma puede ser explicada por dos grandes teorías: la mecánica en donde el incremento de la PIO acarrea importantes alteraciones a nivel de la lámina cribosa que dificulta y obstruye el flujo axoplásmico, y la vasogénica en donde la isquemia debido a una disfunción primaria de la autorregulación capilar de las arterias ciliares cortas posteriores o al efecto de la elevación de la PIO superando a la presión de perfusión conduce a un daño axonal. Sin embargo hay que considerar una variabilidad individual con respecto a la estructura y reactividad del tejido que sostiene a los axones del nervio óptico, explicando así las grandes variaciones en el grado de excavación y atrofia del nervio óptico en respuesta al incremento de la PIO y en la progresión de la neuropatía <sup>(3,6,7)</sup>.

Los efectos de la elevación de la PIO en los tejidos oculares son similares a pesar de la causa del incremento. La visión se compromete principalmente por lesiones en el nervio óptico y en la retina, aunque en la uvea, el cristalino, la cornea y la esclerótica también se observan cambios degenerativos <sup>(4,7,8)</sup>.

El nervio óptico es severamente e irreversiblemente afectado a nivel del disco óptico, en donde el tejido ubicado en la lámina cribosa sufre una compresión que conlleva a una interrupción en el flujo axoplásmico. Eventualmente las fibras nerviosas se atrofian y el incremento de la presión empuja a la lámina cribosa hacia atrás. Posteriormente, se desarrolla una degeneración secundaria de las fibras ascendentes del nervio óptico <sup>(4,5,8,9)</sup>.

La presión intraocular elevada disminuye el flujo sanguíneo al globo ocular causando isquemia. Las células ganglionares de la retina no son capaces de recuperarse aún después de breves periodos de isquemia, y al igual que las fibras nerviosas, las células ganglionares empiezan a degenerar en estadios tempranos del glaucoma. En estadios más avanzados del glaucoma, las capas más externas de la retina también desaparecen, siendo toda la retina reemplazada por tejido cicatrizal de la glía <sup>(3,4,8)</sup>.

Cuando hay un incremento agudo de la presión intraocular (superior a 40mmHg) el músculo constrictor de la pupila se paraliza y la pupila se dilata. La elevación de la PIO por un tiempo prolongado ocasiona una disminución del aporte sanguíneo al iris y al cuerpo ciliar repercutiendo en una atrofia del estroma del iris, del músculo constrictor, del cuerpo ciliar y sus procesos <sup>(4,5,8)</sup>.

El cristalino frecuentemente se encuentra afectado en casos de glaucoma crónico, manifestándose en forma de cataratas asociadas con la luxación o subluxación del lente. La PIO elevada distiende la esclerótica, rompiendo las fibras zonulares que sostienen al cristalino en su lugar acarreado la luxación del mismo. Por lo tanto es muy importante determinar si la luxación del lente fue la causa o el resultado del glaucoma <sup>(4,5,8)</sup>.

En casos de glaucoma agudo hay una alteración en la función del endotelio corneal y un desequilibrio entre las fuerzas hidratantes y deshidratantes en el estroma de la cornea originando el edema corneal. En casos crónicos se puede observar una vascularización superficial y profunda, así como pigmentación <sup>(3,4,5)</sup>.

La buftalmia es el término utilizado cuando la esclerótica se distiende y el ojo aumenta de tamaño en los casos de glaucoma crónico, distensión que es irreversible aún después de disminuida la PIO. En el momento que el ojo se encuentra buftálmico la visión generalmente ya se perdió, aunque el grado de dolor presente es variable <sup>(4,5,7,8)</sup>.

## **1.2 CAUSAS DE GLAUCOMA**

Existen varias causas que originan el glaucoma. Pueden tener desde un origen congénito hasta uno secundario o asociado alguna otra patología. La goniodisgénesis es una alteración congénita bilateral en donde capas de tejido obstruyen el ángulo de drenaje en varios grados desde el nacimiento, provocando un incremento en la PIO con el avance de la edad. La obstrucción del drenaje puede darse también por el acumulo de células inflamatorias en el ángulo iridocorneal, misma inflamación que puede llevar a la formación de sinéquias anteriores o posteriores causando un estrechamiento cada vez mayor del ángulo y por consecuencia la elevación de la PIO. La luxación o subluxación del cristalino es otra alteración a ser considerada como causante de glaucoma una vez que puede generar un bloqueo pupilar y como consecuencia cierre o estrechamiento del ángulo iridocorneal cuando el cristalino se desplaza hacia delante <sup>(4,5,9)</sup>.

## **1.3 CLASIFICACIÓN**

El glaucoma puede ser clasificado de diversas maneras, aunque la más utilizada se basa en la fisiopatología de la obstrucción en el drenaje del humor acuoso, que provoca la elevación de la PIO. El glaucoma canino es clasificado según la etiología y puede ser primario, secundario o congénito <sup>(4)</sup>.

### **1.3.1 GLAUCOMA PRIMARIO**

El perro posee la frecuencia más alta de glaucoma primario entre todos los animales, a excepción del humano, siendo los de ángulo estrecho o cerrado los tipos más comunes

<sup>(1,6,10)</sup>. La hipertensión ocular primaria canina puede ser el resultado de un metabolismo bioquímico anormal de las células trabeculares del sistema de drenaje. Los glaucomas son divididos en glaucoma de ángulo abierto, estrecho o cerrado de acuerdo con el ángulo de la cámara anterior y de la hendidura ciliar si se encuentra abierta o estrecha en la gonioscopia.

El glaucoma primario ha sido descrito en por lo menos 45 razas distintas y se presenta con mayor frecuencia en razas como Cocker Spaniel Americano, Cocker Spaniel Inglés, Fox Terrier Pelo Liso y Pelo de Alambre, Basset Hound, Sealyham Terrier, French Poodle Miniatura y Toy, y Beagle <sup>(11,12)</sup>. Otras razas que recientemente han sido identificadas con glaucoma primario incluyen el Samoyedo, Cazadores de Alces Noruegos, Bouvier de Flandes, Husky Siberiano, Golden Retriever, Gran Danés, Springer Spaniel Inglés, Akita, Chow-Chow y Shar-Pei. Algunas razas parecen estar afectadas con ambos tipos de glaucoma, de ángulo abierto y estrecho, lo que sugiere que estos tipos de glaucoma pueden estar relacionados <sup>(4)</sup>.

Perros con glaucoma avanzado muestran características similares independientemente de la patología, debido al cierre del ángulo iridocorneal (AIC) y con el colapso de la hendidura esclerociliar. La retina se encuentra degenerada con la disminución en el número de las arterias, y con la excavación del disco óptico aumentada y atrófica <sup>(13)</sup>. Los niveles en el vítreo del neurotransmisor glutamato y del óxido nítrico sintasa se encuentran elevados proporcionando evidencias de un mecanismo de isquemia en la muerte de las CGR y en la atrofia de la cabeza del nervio óptico en el glaucoma canino <sup>(2)</sup>.

Dentro de las razas caninas que presentan el glaucoma primario las más investigadas son el Cocker Spaniel Americano con el glaucoma primario ángulo estrecho (GPAE), y el Beagle con el glaucoma primario de ángulo abierto (GPAA). En los Cocker Spaniel Americano el mecanismo de desarrollo del GPAE no está completamente conocido, pero se considera la hipótesis que exista una aposición estrecha del iris que ligeramente aumenta la presión en la cámara posterior, provocando el desplazamiento hacia delante de la base del iris <sup>(4)</sup>. Presenta el mismo mecanismo de desarrollo del glaucoma de ángulo cerrado en humanos, en donde hay un bloqueo en el flujo del humor acuoso de la cámara posterior hacia la anterior. El gran peligro está en el hecho de que

este tipo de glaucoma puede en un momento dado convertirse en un glaucoma de ángulo cerrado, en donde la presión en ataques agudos puede elevarse a más de 80mm Hg. En la gonioscopia de los Cocker Spaniel Americano con hipertensión ocular comúnmente se observa un ángulo iridocorneal estrecho a cerrado y hendidura ciliar reducida, y de acuerdo a la evolución del glaucoma normalmente hay cierre del ángulo y colapso de la hendidura ciliar con la formación de sinéquias periféricas anteriores.

El glaucoma primario de ángulo abierto en los Beagles es el tipo de glaucoma canino más extensamente estudiado. Los animales presentan un glaucoma espontáneo y hereditario de ángulo abierto, cuyos síntomas empiezan a desarrollarse entre los 8 y 16 meses de edad <sup>(1)</sup>. Al inicio, el ángulo iridocorneal y la hendidura esclerociliar están normales. La elevación de la presión intraocular y la disminución en el flujo de salida se desarrolla lentamente, produciendo un ligero aumento en el tamaño del globo ocular, subluxación del cristalino y disminución del ángulo iridocorneal y de la hendidura ciliar en los animales entre 1 y 4 años de edad. La PIO se eleva paulatinamente durante el desarrollo del animal, resultando en eventual cierre del ángulo iridocorneal y de la hendidura ciliar, con PIO entre 40 a 60 mmHg entre los 4 y los 6 años de edad.

### **1.3.2 GLAUCOMA SECUNDARIO Y CONGÉNITO**

En el glaucoma secundario la elevación de la PIO está asociada con alguna enfermedad ocular antecedente o concurrente que obstruye físicamente el flujo de drenaje del humor acuoso. En glaucomas congénitos el incremento de la PIO está asociado con un segmento anterior anormal, debido a que la elevación sucede inmediatamente después del nacimiento <sup>(4)</sup>.

### **1.4 SIGNOS CLÍNICOS**

El glaucoma es una de las patologías oculares que con frecuencia son mal diagnosticados. Este retraso en el diagnóstico temprano de la enfermedad disminuye la eficacia del tratamiento y por consiguiente la preservación de la visión.

Animales con glaucoma agudo comúnmente presentan un dolor intenso manifestado a través de lagrimeo, blefaroespasma e incluso alteraciones en el comportamiento, así como dilatación de las pupilas, congestión episcleral, edema corneal y pérdida de la visión. La PIO generalmente se encuentra superior a 40 mHg, sin embargo el tamaño del globo ocular es normal. En casos de glaucoma crónico se observa una vascularización y pigmentación corneal, excavación de la cabeza del nervio óptico (CNO), luxación del cristalino, fracturas de Descemet, hemorragia intraocular, buftalmia y en casos más avanzados atrofia de la retina y de la CNO y phthisis bulbi <sup>(4,5,8)</sup>.

## **1.5 DIAGNÓSTICO**

El diagnóstico del glaucoma se basa en la observación de los signos clínicos durante el examen oftalmológico, evaluando la medida de la presión intraocular en conjunto con algunos métodos de diagnóstico específicos como la gonioscopía, tonometría, tonografía y electroretinografía. La gonioscopía permite la observación del ángulo iridocorneal mediante el uso de una lente especial que neutraliza el poder de refracción de la córnea permitiendo la visualización del ángulo iridocorneal. La gonioscopía permite la diferenciación del ángulo en cerrado o abierto, y la medición del grado de obstrucción del ángulo. La tonometría permite evaluar la presión intraocular, que por su variación durante el día se recomienda la medición en la mañana y en la noche para la observación de fluctuaciones en los valores. La tonografía permite cuantificar el rango de eliminación del humor acuoso al forzar su flujo mediante un peso constante ejercido sobre la superficie ocular durante 2 a 4 minutos. La electroretinografía evalúa la actividad eléctrica de la retina, siendo una prueba muy eficiente en la evaluación de la función visual de los animales, así como de las células ganglionares de la retina de acuerdo con el estadio del glaucoma <sup>(4)</sup>.

## **2. LÁMINA CRIBOSA Y GLAUCOMA**

La lámina cribosa de muchos animales es una estructura compleja, constituida de múltiples placas adyacentes de colágena, astrocitos, y capilares. Está ubicada en el foramen escleral posterior y proporciona nutrición y soporte mecánico a los axones de las

CGR una vez que hacen el giro de la capa de fibras nerviosas al canal escleral para formar el nervio óptico. Los axones de la capa de fibras nerviosas de la retina son rodeados por los astrocitos formando varios grupos de fibras nerviosas en la lámina cribosa coroidea o anterior, estos mismos astrocitos aíslan las fibras nerviosas de los capilares y la de la MEC que se encuentran alrededor de toda la extensión de la lámina cribosa. Cada placa laminar contiene una serie de poros formados por los astrocitos ubicados de forma lineal a través de los cuales pasan los grupos de fibras del nervio óptico <sup>(6,14)</sup>. En los perros la lámina cribosa está constituida principalmente de colágena tipo I, III y VI, y tienen el doble del grosor (47 nm) de la colágena corneal, además de elastina, dermatan y sulfato de condroitina que contiene proteoglicanos <sup>(7)</sup>. La MEC de la lámina cribosa difiere de la MEC de la esclera que contiene primariamente colágena fibrilar tipo I <sup>(15,16)</sup>. Las fibras de elastina y de colágena en la lámina cribosa actúan como elementos mecánicos para soportar el estrés o la tensión <sup>(16)</sup>.

La elevación de la PIO hace retroceder la lámina cribosa, estira el canal escleral radialmente, y comprime el tejido neuroretinal contra las paredes. En el glaucoma canino la elevación inicial de la PIO causa un movimiento anterior de la lámina, quizá debido a la presión ejercida por el prominente suministro sanguíneo canino orbital en la parte posterior laminar causando un efecto rebote vascular forzando la lámina hacia delante <sup>(6)</sup>. La distorsión conformacional inducida por la PIO en la lámina cribosa escleral resulta en la rotación, compresión, desalineo, y colapso de los poros y canales laminares de tal manera que el flujo axoplásmico en el nervio óptico es reducido y eventualmente bloqueado causando la muerte de las CGR <sup>(14)</sup>. Esta muerte de las CGR y pérdida de los axones es observado oftalmológicamente e histológicamente en humanos, perros, y caballos con glaucoma como un aumento en el tamaño de la excavación de la cabeza del nervio óptico y una disminución en el área del borde neuroretinal. La lámina cribosa de los perros está constituida por 10 a 15 capas, con aproximadamente 250 poros de 12 a 50  $\mu\text{m}$  de diámetro, no observándose diferencias en la distribución regional de los poros de diferentes tamaños <sup>(17)</sup>. Se supone que los poros de mayor tamaño de la lámina cribosa escleral deben de proporcionar un menor soporte estructural para mantener la integridad de la lámina cribosa bajo condiciones de elevada PIO debido a que el tejido conectivo que forma los septos es muy delgado. Si la lámina cribosa escleral fuera rígida, los poros de mayor tamaño podrían proporcionar menor resistencia al flujo axoplásmico a los axones del nervio óptico; sin embargo una vez que la lámina es formada por un tejido elástico, la



falta de soporte proporcionada por los poros de mayor tamaño puede hacer que los axones sean más susceptibles a colapsarse y causen una reducción u obstrucción en el flujo axoplásmico del nervio óptico <sup>(6,14)</sup>.

A cada nivel de la PIO existe un riesgo de daño glaucomatoso, aunque el riesgo aumenta de acuerdo a la elevación de la PIO. El daño puede ocurrir con extrema rapidez como en el glaucoma de ángulo cerrado, o puede progresar lentamente como en los glaucomas de tipo crónico. La sensibilidad del nervio óptico a un nivel en particular de la PIO puede cambiar con el tiempo a un daño progresivo ocurriendo aún con una PIO que antes juzgáramos ser segura <sup>(6)</sup>. El daño observado en el nervio óptico glaucomatoso a PIO relativamente bajas puede ser asociado a un estrés del nervio óptico inducido mecánicamente, mientras que un daño al nervio óptico debido a una PIO elevada resulta más en una falla en la autorregulación. Los axones del nervio óptico de mayor diámetro parecen ser particularmente sensibles a una PIO elevada y a otros factores incitantes encontrados en el glaucoma humano, mono, canino y equino. Incluso pequeñas elevaciones en la PIO pueden reducir el flujo axoplásmico en los axones de mayor diámetro, con subsiguiente colapso del axon, la degeneración y atrofia axonal <sup>(18)</sup>. La debilidad del tejido de la MEC de soporte de la lámina cribosa, como observado en los ojos de humanos con glaucoma y que puedan existir en otras especies con glaucoma, puede también exacerbar esta tendencia de que los axones de mayor diámetro se colapsen <sup>(19)</sup>.

### **3. FACTOR NEUROTROFICO DERIVADO DEL CEREBRO (FNDC)**

El factor neurotrófico derivado del cerebro (FNDC) es un polipéptido de 27 kDa producido primariamente en el sistema nervioso central <sup>(20,21)</sup> que es capaz de mantener selectivamente la supervivencia y el crecimiento de las fibras de neuronas embrionarias en el momento que estas neuronas están estableciendo contacto con células blanco <sup>(22)</sup>. Presenta actividad muy específica, en donde es necesaria la presencia de determinada cantidad de la proteína para que se observe un efecto, así como una selectividad y tiempo de acción durante el desarrollo <sup>(22)</sup>. Las neurotrofinas, en particular el FNDC, tienen un papel importante en el desarrollo <sup>(23)</sup>, mantenimiento, supervivencia y reparo de las CGR durante el desarrollo de la retina y posterior a un daño severo <sup>(24)</sup>. Resultados de varios

estudios indican que las células ganglionares de la retina de ratas neonatas no pueden sobrevivir in vitro a menos que permanezcan en un medio suplementado con extractos derivados del cerebro <sup>(22)</sup>. El FNDC retarda la pérdida neuronal de las CGR y de la capa interna de la retina, y promueve la regeneración axonal posterior a una hipoxia retinal y transección del nervio óptico <sup>(25,26)</sup>. La presencia de elevados niveles del FNDC en el suero humano sugiere que esta neurotrofina tiene un papel importante en la reparación tisular. El FNDC liberado en el sitio dañado podría servir como fuente temporal a las neuronas del área alrededor <sup>(20)</sup>.

Una hipótesis a ser considerada es que la obstrucción del transporte axonal inducido por la elevación de la presión intraocular a nivel de la cabeza del nervio óptico, inhibe la entrega retrógrada de sustancias neurotróficas (NT) a las CGR <sup>(27)</sup>. Dichas neurotrofinas son muy importantes y requeridas para la supervivencia de las CGR, si estas neuronas no reciben el aporte apropiado de señales químicas provenientes de otras neuronas del cerebro y del cuerpo geniculado lateral (CGL) entran en apoptosis (muerte celular programada). En el caso de las células de la retina, la señal llegaría a través del transporte axonal retrógrado procedente de las sinapsis localizadas en el núcleo geniculado lateral <sup>(28,29)</sup>. Estudios realizados en humanos y perros con glaucoma sugieren que la obstrucción en el transporte axonal anterógrado y retrógrado está presente en los axones de las CGR a nivel de la cabeza del nervio óptico. Estas señales químicas son proporcionadas por las neurotrofinas existentes como el factor neurotrófico derivado del cerebro (FNDC), factor de crecimiento del nervio (FCN), y las neurotrofinas 3, 4, 5 (NT-3 y NT 4/5) que son considerados como los factores donde la interrupción de sus transportes puede conducir a la muerte de las CGR <sup>(30)</sup>. Estas neurotrofinas interactúan con receptores transmembranales específicos situados en la superficie celular y son incorporados en forma de vesículas para el transporte retrógrado en el interior de la célula <sup>(28)</sup>. Dichos receptores incluyen los receptores de tirocinasa tipos A, B y C (TrkA, TrkB y TrkC) que son activados primariamente por la FCN, FNDC y NT-3, y NT-4/5 respectivamente. Otro receptor existente es el receptor p75 (p75NTR) que presenta una pequeña afinidad por todas las neurotrofinas, pero con diferentes cinéticas <sup>(31)</sup>.

#### 4. RECEPTOR TIROCINASA TIPO B Y P75

El FNDC ejerce su influencia en las células ganglionares y otras células de la retina a través de los receptores TrkB. Existen dos tipos de receptores TrkB: el completo y el truncado. Cuando la neurotrofina se une al dominio extracelular del receptor completo induce a la fosforilación de los residuos de la tirosina en el dominio citoplasmático, desencadenando varias señales intracelulares que ya fueron demostradas que regulan la expresión del gen relacionado con la muerte y supervivencia celular <sup>(32,33)</sup>.

El locus del TrkB exhibe un complejo patrón transcripcional, con por lo menos 8 transcritos distintos con tamaños de entre 0.7 a 9.0 kb. Codifica para al menos dos diferentes clases de receptores, uno de estos receptores es el gp145 <sup>trkB</sup> (designado como TrkB <sup>TK+</sup>) una molécula glicosilada de 145 kDa con 821 aminoácidos que contiene todas las estructuras de los receptores tirosinasa incluyendo una pequeña cola de terminal carboxilo de 15 aminoácidos, formando el receptor completo. La segunda clase de receptores designados como TrkB <sup>TK-</sup> tienen el mismo dominio extracelular y transmembranal que los TrkB <sup>TK+</sup>, sin embargo poseen un dominio citoplasmático muy pequeño y la ausencia de toda la región catalítica kinasa, formando el receptor truncado. Se conocen dos isoformas no catalíticas del receptor TrkB <sup>TK-</sup>, el gp 95 <sup>trkB</sup> o TrkB.T1 una molécula de 95kDa aislada del cDNA de bibliotecas de ratas y ratones y expresados en el cerebro de ratones adultos; y el TrkB.T2 que ha sido aislado del cDNA de la biblioteca del cerebelo de ratas <sup>(32)</sup>.

La función de la familia Trk de proteínas tirocinasa kinasa es de funcionar como receptores de señal para las neurotrofinas como el factor neurotrófico derivado del cerebro (FNDC), factor de crecimiento del nervio (FCN), y las neurotrofinas 3, 4, 5 (NT-3 y NT 4/5). El receptor TrkB es activado por un proceso de dos pasos que involucra la oligomerización mediado por el ligando de los receptores de moléculas en la superficie celular seguida por la autofosforilación de sus residuos tirocinasa <sup>(32)</sup>. La señal mediada por el FNDC no ocurre en las células que expresen un receptor TrkB defectuoso o que hayan sido tratados con K252a, un alcaloide que en bajas concentraciones inhibe específicamente la actividad kinasa de la familia de los receptores Trk <sup>(34)</sup>.

El locus del TrkB es expresado extensamente en el sistema nervioso central y sistema nervioso periférico. El RNAm de la forma completa del TrkB (TrkB<sup>TK+</sup>) es expresado en la mayoría de las neuronas del sistema nervioso central, pero no en células no-neuronales como los astrocitos, oligodendrocitos y células del plexo coroideo. Contrastando con la forma truncada (TrkB.T1) que se localiza predominantemente en las células no-neuronales (astrocitos y epitelio coroideo). Los altos niveles de expresión de la forma truncada del receptor TrkB en diferentes regiones del sistema nervioso central indican que debe de existir algún mecanismo para restringir la distribución o modular la acción del FNDC después de que son liberados en sus sitios de síntesis. En el caso del FNDC, la presencia de la forma truncada del receptor TrkB en los astrocitos puede tener la función de producir una alta concentración local del FNDC, y con eso prevenir su difusión a sitios de acción inapropiados <sup>(32)</sup>.

El receptor p75 es una glicoproteína de 75 kDa que se une a todas las neurotrofinas con similar afinidad pero con diferente cinética, tiene la función de ayudar a asegurar la especificidad de cada neurotrofina con sus receptores tirosinasa y en la inducción de la apoptosis en neuronas en desarrollo <sup>(35,36)</sup>. Se reporta la existencia de un tipo de receptor p75 truncado producido por las células de Schwann, esta forma truncada ha sido encontrada en altos niveles en los neonatos que declina a niveles muy bajos pero todavía detectables en los adultos <sup>(36)</sup>. En la retina, el receptor p75 ha sido localizado en las células ganglionares (CGR) <sup>(37)</sup> y en las células de Müller <sup>(38)</sup>. Se conoce también su expresión en las células de Schwann en el sistema nervioso periférico posterior a un daño en el nervio <sup>(35)</sup>. Las CGR son cubiertas por una vaina delgada formada por los procesos de las células de Müller. Debido a la íntima relación de los procesos gliales de las células de Müller con las CGR es muy difícil determinar la ubicación exacta del receptor a nivel de microscopia de luz. No obstante bajo el microscopio electrónico se ha demostrado la localización precisa de p75 exclusivamente en las células de Müller <sup>(35)</sup>.

## **5. INTERACCIÓN NEUROTROFINA FNDC Y RECEPTORES TrKB Y P75**

La neurotrofina FNDC interactúa con su receptor específico TrkB y con menor afinidad al receptor p75. Para unirse al FNDC el receptor TrkB tiene que formar un dímero con su forma completa para ser capaz de transmitir la señalización, sin embargo la forma

truncada del receptor TrkB puede unirse a su forma completa y formar un heterodímero no funcional incapaz de mediar la señalización del FNDC <sup>(39)</sup>. Estudios realizados en ratones mutantes en donde el gen para FNDC está mutado han demostrado que hay una elevación en la tasa de muerte de las CGR en desarrollo, de esta manera el FNDC endógeno existente reduce esta tasa de muerte de las CGR durante el desarrollo normal. Igualmente se demostró que animales mutantes para el receptor TrkB en su forma completa y del receptor p75 pueden alterar la dinámica de la muerte neuronal. Aunque en animales mutantes para el FNDC solo o en combinación con el receptor TrkB se eleva la tasa de muerte de las CGR en desarrollo, esta condición no altera el número final de las CGR que permanecen después que el periodo de muerte de estas células se completa <sup>(40)</sup>.

La presencia de la proteína del FNDC y de sus receptores TrkB y p75 en las células ganglionares de la retina ya ha sido reportado en varias especies <sup>(41,42,43)</sup>, así como la expresión del RNAm del FNDC y del receptor TrkB <sup>(31,44)</sup>. La localización celular de las neurotrofinas y de sus receptores en las neuronas de la retina proporciona información pertinente a la función ejercida por cada neurotrofina y cada receptor, y de esta manera auxilia en la comprensión del mecanismo de acción e interacción de estas moléculas en las diversas reacciones intracelulares.

#### **IV - JUSTIFICACIÓN**

El FNDC es una neurotrofina muy importante en el mantenimiento y supervivencia de las células ganglionares de la retina y se encuentra disminuida en ojos con glaucoma. El glaucoma espontáneo canino ha sido reportado como un modelo animal que asemeja la mayoría de las fisiopatologías descritas en el glaucoma humano. Por lo tanto, la determinación de la expresión del FNDC y de sus receptores TrkB y p75 en ojos normales auxiliaría en la comprensión de las alteraciones observadas en las distintas enfermedades oculares en las que se encuentren involucradas estas proteínas. Esto permitiría posteriores estudios de terapia génica utilizando células genéticamente modificadas, para el suministro de neurotrofinas biológicamente producidas a las células de la retina, para que de esta manera estas células puedan producir el FNDC y poder contrarrestar las neurotrofinas deficientes relacionadas con la degeneración y apoptosis de las CGR durante el glaucoma. En este mismo sentido, se podrían facilitar nuevos acercamientos para la protección de las CGR que auxiliarían en la preservación de la visión.

## **V - HIPÓTESIS**

La distribución de las proteínas del Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (FNDC), y de sus receptores Tirocinasa Tipo B (TrkB) y p75, es similar en ojos normales y con glaucoma, disminuyendo solamente el número de células que las expresan en los ojos glaucomatosos.

## VI - OBJETIVOS

Objetivo general:

Estudiar el patrón de expresión de la proteína del Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (FNDC) y sus receptores TrkB y p75 en retinas de perros normales y glaucomatosos.

Objetivos particulares:

- 1) Determinar el patrón de expresión de la proteína del FNDC y los receptores TrkB y p75 en retinas normales.
- 2) Correlacionar el sitio de expresión de la proteína del Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (FNDC) y sus receptores TrkB y p75 en retina de perros normales y glaucomatosos a través de colocalización por inmunofluorescencia.
- 3) Cuantificar los niveles de expresión en tiempo real del RNAm del Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (FNDC) en la retina dorsal, retina ventral, úvea anterior (iris y cuerpo ciliar), y vítreo de ojos normales por RT-PCR de Tiempo Real.
- 4) Analizar se existe diferencia en la expresión del RNAm del Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (FNDC) en las distintas regiones de los ojos normales.



## **VII - MATERIAL Y MÉTODOS**

### **1. INSTITUCIONES**

El presente estudio se realizó de septiembre del 2003 a junio del 2006 en las instalaciones del Hospital de Pequeñas Especies de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) y en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Ciudad de México, D.F., y en el Departamento de Biología Molecular de la Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Estatal de Louisiana, E.E.U.U.

### **2. ANIMALES EXPERIMENTALES**

Se evaluaron animales con diagnóstico de glaucoma en el Hospital de Pequeñas Especies, FMVZ, UNAM. Los pacientes fueron sometidos al examen oftalmológico completo y valoración de la PIO, y fueron candidatos para el estudio los que empezaron a ser refractarios a los tratamientos prescritos, momento en que se realizó la enucleación de los ojos según la técnica descrita por Slatter (1990)<sup>(45)</sup>. Se utilizaron un total de 35 ojos de los cuales: 29 ojos normales y 6 ojos glaucomatosos que después de realizada la enucleación fueron almacenados (a temperatura de -4°C o a -70°C como se describe a continuación) para su posterior análisis.

El grupo control fue conformado por ojos y por muestras de regiones del cerebro de perros sanos proporcionados por el Departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

### **3. EXAMEN CLÍNICO DE LOS ANIMALES**

A todos los animales utilizados en este estudio se les realizó un examen oftalmológico completo que incluye un examen neuro-oftalmológico, prueba de Schirmer, prueba de tinción con fluoresceína, tonometría de aplanación (Tonopen, Mentor Ophthalmics, MA), biomicroscopia con el uso de la lámpara de hendidura (Kowa SL

14, Kowa Optimed, CA), y la oftalmoscopia indirecta (Heine Omega 150, Dover, NH). Los perros normales incluidos en el estudio presentaban PIO inferior a 20 mmHg, un ángulo iridocorneal normal, y una cámara anterior y segmento posterior normal.

Como criterio de inclusión se identificaron como animales con glaucoma los que presentaron la PIO excediendo los 25 mm Hg (considerando que los valores de la PIO en perros normales, medido por tonometría de aplanación con el Tonopen, es de  $16.8 \pm 4.0$  mmHg), en conjunto con algunos signos clínicos como congestión episcleral, pupilas midriáticas, un ángulo iridocorneal estrecho a cerrado, buftalmia, excavación de la cabeza del nervio óptico, adelgazamiento del borde neuroretinal, degeneración de la retina, así como cambios en la visión. Los animales identificados con glaucoma fueron además clasificados de acuerdo al tiempo de evolución de la enfermedad según criterios personales en: glaucoma temprano, moderado y avanzado. Para el glaucoma temprano se consideró el tiempo de evolución de 1 a 12 semanas, para el glaucoma moderado de 5 meses a 1 año, y para el glaucoma avanzado con más de 1 año de evolución.

#### **4. OBTENCIÓN DE MUESTRAS**

Las muestras de ojos de perros normales y glaucomatosos obtenidas para la técnica de inmunofluorescencia fueron mantenidas completas y fijadas en paraformaldehído al 4% para su posterior estudio. Los ojos normales obtenidos para el análisis con RT-PCR de Tiempo Real fueron divididos en retina dorsal, retina ventral, úvea anterior (cuerpo ciliar e iris) y vítreo, en tubos Eppendorf, e inmediatamente congelados en nitrógeno líquido y almacenados a  $-70^{\circ}\text{C}$  para la posterior extracción del RNAm.

#### **5. INMUNOFLUORESCENCIA**

Se utilizaron anticuerpos primarios policlonales de conejo contra el epítipo de la terminal amino del FNDC humano (N-20;  $200\mu\text{g/ml}$ ; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) y contra el epítipo de la terminal carboxila del receptor TrkB de ratón (794;  $200\mu\text{g/ml}$ ; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), así como el anticuerpo primario policlonal de cabra contra el epítipo de la terminal amino del receptor p75 (N-20;

200µg/ml; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Los tejidos se fijaron en una solución de paraformaldehído al 4% en buffer de fosfatos (PBS) a temperatura ambiente, lavados con PBS, e incubados toda la noche en una solución amortiguadora de sacarosa 30% a 4°C. Posteriormente se incluyeron en Tissue-Tek (Sakura Finetek; USA) y congelaron a -70°C. Se realizaron cortes sagitales de 20µm de grosor en un criostato (Criostato JUNG CM3000; Leica Instruments GmbH; Germany) a una temperatura constante de -20°C. Las secciones se colocaron en laminillas previamente cubiertas con poli-L lisina para inmunofluorescencia. Las secciones fueron tratadas con lavados con PBS por 10 minutos, Triton 1% por 10 minutos, PBS por 5 minutos y albumina 1% en PBS por 2 horas a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios fueron diluidos a una concentración de 1:200 para el FNDC, 1:200 para el TrkB y 1:250 para el p75 en albumina 1% e incubados toda la noche a una temperatura de 4°C. La ubicación morfológica de la proteína y sus receptores se llevó a cabo con ayuda de anticuerpos secundarios anti-conejo rodaminado y anti-cabra fluoresceinado a una dilución de 1:100. Las secciones controles fueron tratadas de la misma manera pero omitiendo los anticuerpos primarios. Las secciones fueron posteriormente montadas con medio especial para fluorescencia (DAKO Fluorescent Mounting Medium; DAKO Corporation; USA) y visualizadas por microscopia confocal con un microscopio escáner a láser (LSM 5 Pascal; Zeiss).

## **6. DOBLE INMUNOFLUORESCENCIA**

Se realizó la doble inmunofluorescencia para la colocación de los receptores TrkB y p75 utilizando los mismos anticuerpos primarios policlonales de conejo contra el epítipo del terminal carboxilo del receptor TrkB (794; 200µg/ml; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), y el anticuerpo primario policlonal de cabra contra el epítipo de la terminal amino del receptor p75 (N-20; 200µg/ml; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Los tejidos fueron procesados en una primera etapa para la localización del receptor TrkB de la misma manera que el protocolo para la inmunofluorescencia descrita anteriormente. Una vez incubado el anticuerpo secundario para la detección de TrkB, las laminillas fueron postfijadas nuevamente en una segunda etapa en paraformaldehído al 4% en PBS a temperatura ambiente por 15 minutos, 3 lavados con PBS por 10 minutos, siguiendo los pasos de la inmunofluorescencia simple a partir del Triton 1% por 10 minutos, PBS por 5 minutos y albúmina 1% en PBS por 2 horas a

temperatura ambiente e incubadas con el anticuerpo primario anti-p75. Los anticuerpos primarios fueron adicionados igualmente a una dilución de 1:200 para el TrkB y 1:250 para el p75 en albumina 1% e incubados toda la noche a una temperatura de 4°C, así como los anticuerpos secundarios anticonejo rodaminado y anticabra fluoresceinado a una dilución de 1:100. Las laminillas fueron posteriormente montadas de la misma manera que en la inmunofluorescencia y visualizadas por microscopia confocal.

## **7. INMUNOFLUORESCENCIA “IN TOTO” DEL FACTOR NEUROTROFICO DERIVADO DEL CEREBRO**

Se utilizó el anticuerpo primario policlonal de conejo contra el epítipo de la terminal amino del FNDC humano (N-20; 200µg/ml; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Los tejidos se fijaron en una solución de paraformaldehído al 4% en buffer de fosfatos (PBS) por toda la noche a temperatura de 4°C, lavados con PBS por 30 minutos e incubados toda la noche en una solución amortiguadora de sacarosa 30% a 4°C. Posteriormente las retinas fueron aisladas y cortadas en cuatro cuadrantes respectivamente: cuadrante dorsal temporal, dorsal nasal, ventral temporal y ventral nasal. Cada cuadrante fue dividido en dos partes iguales conteniendo regiones de la retina periférica y retina central. Cada segmento fue tomado de manera alternada para la realización de la inmunofluorescencia “in toto” para el FNDC y para la doble inmunofluorescencia “in toto” para los receptores TrkB y p75. Las secciones fueron lavadas con PBS por 30 minutos, Triton 1% a 4°C por toda la noche, PBS por 30 minutos y albumina 1% en PBS a 4°C por toda la noche. El anticuerpo primario fue adicionado a una dilución de 1:200 para el FNDC en albumina 1% + Tween 0,1% en PBS e incubado toda la noche a una temperatura de 4°C. La ubicación morfológica de la proteína se llevo a cabo utilizando el anticuerpo secundario anti-conejo rodaminado a una dilución de 1:100. Las muestras controles fueron tratadas de misma manera pero omitiendo el anticuerpo primario. Las secciones fueron posteriormente montadas con medio especial para fluorescencia (DAKO Fluorescent Mounting Medium; DAKO Corporation; USA) y visualizadas por microscopia confocal con un microscopio escáner a láser (LSM 5 Pascal; Zeiss).

## **8. DOBLE INMUNOFLUORESCENCIA “IN TOTO” DE LOS RECEPTORES TrkB Y P75**

Se realizó la doble inmunofluorescencia para la colocalización de los receptores TrkB y p75 utilizando los anticuerpos primarios policlonales de conejo contra el epítoto de la terminal carboxila del receptor TrkB (794; 200µg/ml; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), y el anticuerpo primario policlonal de cabra contra el epítoto de la terminal amino del receptor p75 (N-20; 200µg/ml; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Los tejidos fueron procesados en una primera etapa para la localización del receptor TrkB de la misma manera que el protocolo para la inmunofluorescencia “in toto” descrita anteriormente. Una vez incubado el anticuerpo secundario y que se realizaron los lavados, en una segunda etapa las retinas fueron postfijadas nuevamente en paraformaldehído al 4% en PBS a temperatura ambiente por 30 minutos, 6 lavados con PBS por 15 minutos, Triton 1% por 3 horas, PBS por 30 minutos y albúmina 1% en PBS por toda la noche a 4°C. Los anticuerpos primarios fueron adicionados igualmente a una dilución de 1:200 para el TrkB y 1:250 para el p75 en albumina 1% + Tween 0,1% e incubados toda la noche a una temperatura de 4°C, así como los anticuerpos secundarios anti-conejo rodaminado y anti-cabra fluoresceinado a una dilución de 1:100. Las muestras controles fueron tratadas de la misma manera pero omitiendo los anticuerpos primarios. Finalmente las secciones fueron montadas con medio especial para fluorescencia (DAKO Fluorescent Mounting Medium; DAKO Corporation; USA) y visualizadas por microscopia confocal con un microscopio escáner a láser (LSM 5 Pascal; Zeiss).

## **9. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL RNAm**

Siguiendo a las especificaciones del fabricante (TRI Reagent® LS- Molecular Research Center Inc) se aisló el RNA total de las muestras congeladas homogeneizando 0.25mg de tejido en 0.75ml de TRIzol®. Se dejó el homogeneizado en reposo por 15 minutos a temperatura ambiente y se adicionó 0.20ml de cloroformo por cada 0.75ml de TRIzol. Se agitó vigorosamente (vortex) por 15 segundos y nuevamente se dejó en reposo por 15 minutos a temperatura ambiente antes de centrifugar a 14000 rpm por 20 minutos a 4°C. La fase acuosa que contiene el RNA total fue posteriormente separada en tubos nuevos de Eppendorf lavados con agua DEPC (dietilpirocarbonato) y se adicionó 0.5ml de isopropanol para cada 0.75ml de TRIzol. Se homogeneizó y se dejó en reposo por 10

minutos a temperatura ambiente para posteriormente centrifugar a 14000 rpm por 20 minutos a 4°C. El sobrenadante fue removido y el botón de RNA lavado una vez con 150 µl de etanol 75%. Se centrifugó nuevamente a 14000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente y el etanol fue removido. El botón de RNA fue diluido en 30 a 50 µl de agua DEPC y almacenado a -70°C hasta su cuantificación.

El RNA total de cada muestra fue cuantificado utilizando SYBR® Green (SYBR® Green II RNA gel stain, Molecular Probe, Oregon, USA) como marcador fluorescente. Se utilizó un RNA humano (Control RNA Human 50 ng/µl, Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) de concentración conocida como muestra control. Se homogeneizó 2.5 µl de cada muestra con 2.5 µl de SYBR Green, y utilizando el equipo FluorChem™ 8800 (Alpha Innotech, USA) la concentración del RNA total fue obtenida comparando la densidad del brillo fluorescente de las muestras de los ojos normales con la muestra control.

## **10. OLIGONUCLEÓTIDOS Y SONDA**

Con base en la secuencia del RNAm del FNDC canino proporcionado por la biblioteca de Gen Bank (AB105074) se diseñaron la secuencia de los oligonucleótidos y de la sonda utilizando el programa Primer Express (PE-Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Los oligonucleótidos sentido 5'-AACATAAGGACGCGGACTTGT-3' y antisentido 5'-GAGGCTCCAAAGGCACTTGA-3' (Gene Lab, Department of Pathobiological Sciences, School of Veterinary Medicine, Louisiana State University, LA, USA) amplificaron un fragmento de 67pb en la que se unía la sonda marcada 5'-TACCTCCCGGGTGATGCTCAGCA-3' (Primers & Probes, PE Biosystems, ABI PRISM, CA, USA). La sonda contiene un 6-carboxy-fluoresceinado (FAM) como marcador reportero fluorescente, y un 6-carboxitetrametil-rodaminado (TAMRA) como "quencheador" para la emisión de su espectro de luz.

## 11. REVERSE TRANSCRIPTASE – POLYMERASE CHAIN REACTION DE TIEMPO REAL (RT-PCR DE TIEMPO REAL)

Se utilizó el equipo ABI PRISM 7700 Sequence Detector (Perkin Elmer, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) para realizar la técnica cuantitativa de RT-PCR de Tiempo Real, con base en la metodología de fluorescencia del TaqMan para cuantificar el rango de números de copias del FNDC. En este método se utiliza una sonda marcada con un marcador reportero fluoresceinado que emite el espectro de luz captada por el equipo. Durante la fase de extensión de la PCR, la sonda hibridiza a la secuencia blanco y es separada debido a la actividad exonucleasa 5'-3' de la Taq polimerasa. El incremento de la señal es directamente proporcional a la hibridación de la sonda fluorescente y sirve para comprobar los productos específicos de la PCR (del inglés Polymerase Chain Reaction), así como cuantificar su cantidad relativa en comparación a un control interno conocido (18S, GAPDH, etc.), proporcionando una cuantificación altamente precisa y reproducible. Se utilizaron muestras de cerebro de perros normales como muestra estándar y como calibrador, así como el 18S como referencia endógena y normalizador. Como control negativo en la RT-PCR se utilizó agua bidestilada estéril en lugar del RNA.

El calibrador es una muestra de concentración conocida utilizada para la construcción de una curva estándar que nos proporciona valores importantes para el cálculo de la concentración de las muestras blanco (valores  $m$  y  $b$ ). El calibrador es la muestra utilizada como base en la comparación de los resultados. Para todas las muestras experimentales, la cantidad final de la muestra blanco es determinada a partir de valores de la curva estándar y dividida por la cantidad del calibrador. De esta manera, el calibrador es la muestra 1X y todas las otras cantidades son expresadas como  $n$ -veces de diferencia relativa con el calibrador.

La referencia es una señal pasiva o activa utilizada para normalizar los resultados experimentales. Los controles endógenos o exógenos son ejemplos de referencias activas. Como referencia activa se entiende como la señal que es generada como resultado de la amplificación de la PCR. En este experimento se utilizó el 18S, un control endógeno que es un RNA presente en cada muestra experimental de manera aislada. Utilizando un control endógeno como una referencia activa se puede normalizar la

cantidad del RNAm blanco para las diferencias en la cantidad del RNA total agregada en cada reacción.

El valor del ciclo umbral o  $C_u$  es el número de ciclos de la PCR necesarios para alcanzar el umbral de fluorescencia proporcionado por la sonda y detectable por el equipo. El valor del  $C_u$  es proporcional al log de la cantidad inicial del cDNA formado. Utilizando los valores del  $C_u$  de una muestra desconocida y los valores proporcionados en la curva estándar, la cantidad en ng (nanogramos) de la secuencia blanco en la muestra puede ser calculada.

Cantidad en log =  $C_u$  muestra - b/ m

ng =  $10^{\text{cantidad en log}}$

ng normalizado = ng muestra / ng 18S

Las reacciones se realizaron utilizando kits TaqMan One-Step RT-PCR Master Mix Reagents (Applied Biosystems, New Jersey, USA) que combinan los componentes clave en una mezcla master diseñada para el RCP-TR de una sola etapa. Para cada reacción se calculó un volumen total de 25  $\mu$ l siendo 12.5  $\mu$ l de 2X One-Step Master Mix, 0.625  $\mu$ l de la enzima 40X MultiScribe, 0.5  $\mu$ l del oligonucleótido sentido a 20  $\mu$ M, 0.5  $\mu$ l del oligonucleótido antisentido a 20  $\mu$ M, 0.5  $\mu$ l de la sonda a una dilución de 1:10, 5.0  $\mu$ l de la muestra y 5.375  $\mu$ l de agua bidestilada.

Se utilizaron las condiciones universales del termociclador para todas las muestras, donde la etapa de transcripción reversa se realizó a 48°C por 30 minutos, la polimerasa (AmpliTaQ Gold) fue activada a 95°C por 10 minutos y posteriormente se realizaron 40 ciclos de la PCR a 95°C por 15 segundos y 60°C por 1 minuto cada una.

## **12. GRUPO CONTROL**

Las muestras normales controles también fueron sometidas a las mismas pruebas de inmunofluorescencia y RT-PCR de Tiempo Real para el análisis de la expresión de los patrones del FNDC y sus receptores TrkB y p75.



### **13. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los valores de Cu obtenidos en el RT-PCR de tiempo real fueron convertidos a valores relativos con relación al cerebro (RNAm del FNDC expresada en la región analizada comparada al cerebro). Se realizó un análisis estadístico descriptivo de los valores de Cu provenientes de la reacción con el FNDC y con el normalizador 18S, así como los valores de expresión para las distintas partes del ojo: retina dorsal, retina ventral, úvea anterior y vítreo.

Para el análisis de los datos se consideró que el comportamiento de cada globo ocular es independiente dentro de cada animal. Debido a la falta de normalidad y el poco número de observaciones (N=20) se utilizó el método de Wilcoxon (de rango) para la comparación entre las diferentes regiones del ojo. (paquete SAS, ver 8). Con respecto a la región de la úvea anterior no pudo ser estimado a través de esta metodología.

## VIII - RESULTADOS

### 1. INMUNOFLUORESCENCIA

A través de la técnica de inmunofluorescencia fue posible determinar en las secciones criopreservadas la localización celular del FNDC y de los receptores TrkB y p75 en la retina de 4 ojos normales y 3 ojos glaucomatosos.

En los ojos normales la detección más preponderante del FNDC, TrkB y p75 fue en el citoplasma de las células ganglionares de la retina (CGR), observándose un marcaje fluorescente intenso. El marcaje del FNDC fue también observado en diversas capas de la retina en diferentes intensidades. Con una intensidad moderada el FNDC fue detectado en la capa de fotorreceptores, capa nuclear externa (CNE), capa plexiforme externa (CPE), y en la capa de fibras nerviosas (CFN). Un marcaje más débil se observó en la capa nuclear interna (CNI), así como en la capa plexiforme interna (CPI) (Fig.1A,1B y 1C). El receptor TrkB fue detectado de una manera muy representativa, focal e intensa en el citoplasma de las células ganglionares de la retina y a lo largo de su axon indicando la presencia de un transporte axonal (Fig.1D y 1E). La presencia del TrkB fue detectada además con un marcaje moderado y más difuso en la capa de fotorreceptores, CNI, CPI, y CFN. La expresión positiva del receptor p75 fue observada de forma intensa en la capa de fibras nerviosas, y de una manera más tenue en la CPI y en la capa de fotorreceptores (Fig.1F y 1G). No se observó ningún marcaje en el epitelio pigmentado de la retina.

En las secciones de retina en donde se realizó la colocalización de los receptores TrkB y p75 se observó un marcaje intenso en el citoplasma de las CGR, y de una forma más moderada en la capa de fotorreceptores, CNI, y CFN. Hallazgos que estuvieron de acuerdo al marcaje observado en las laminillas preparadas para la inmunofluorescencia de los receptores en separado (Fig.2). No se observó ningún marcaje en las secciones controles cuando el anticuerpo primario fue omitido (Fig.5A).

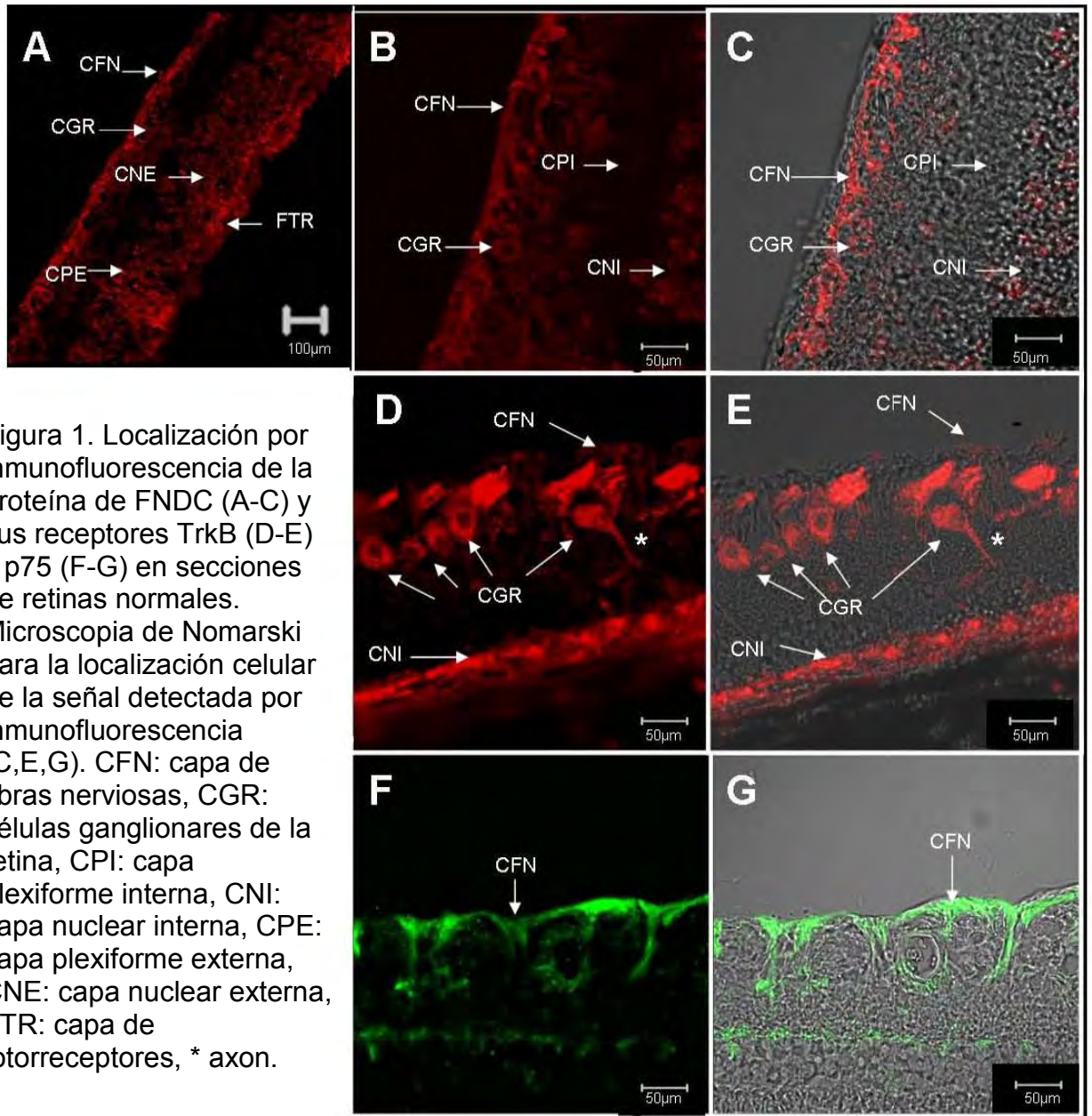


Figura 1. Localización por inmunofluorescencia de la proteína de FNDC (A-C) y sus receptores TrkB (D-E) y p75 (F-G) en secciones de retinas normales. Microscopia de Nomarski para la localización celular de la señal detectada por inmunofluorescencia (C,E,G). CFN: capa de fibras nerviosas, CGR: células ganglionares de la retina, CPI: capa plexiforme interna, CNI: capa nuclear interna, CPE: capa plexiforme externa, CNE: capa nuclear externa, FTR: capa de fotorreceptores, \* axon.

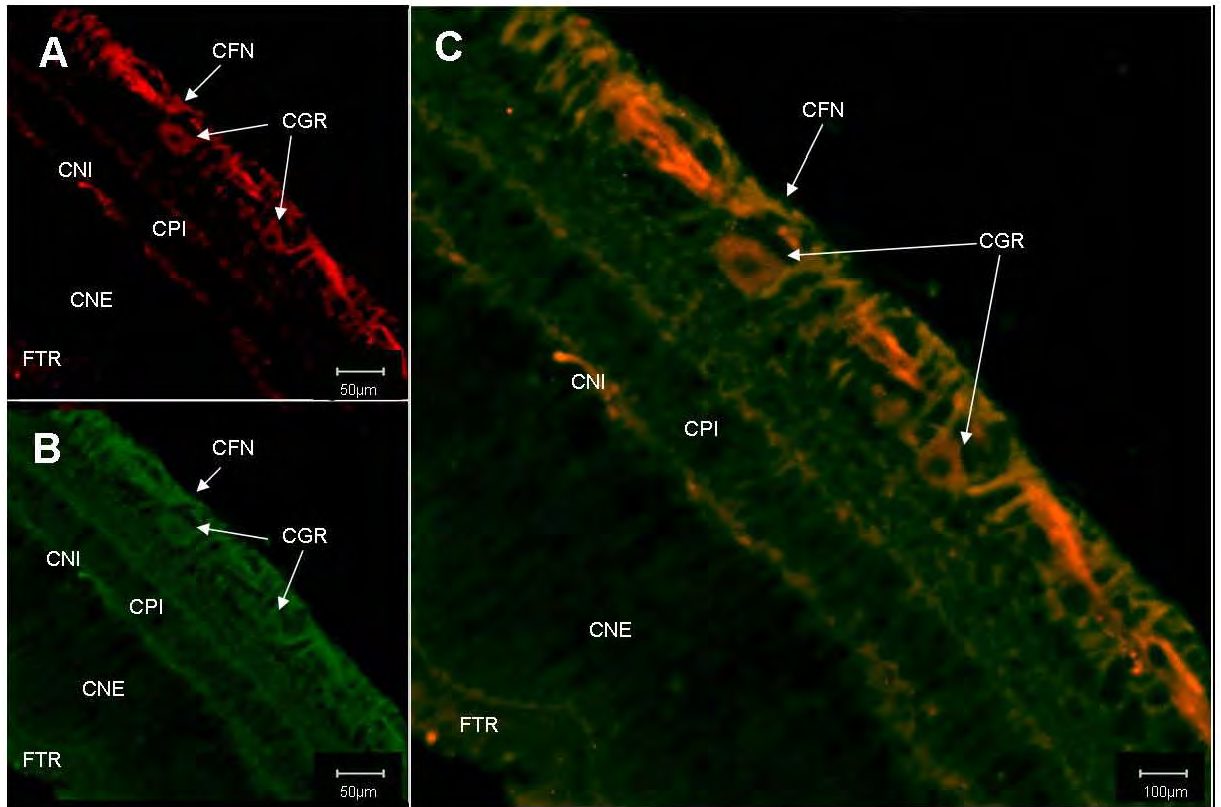


Figura 2. Colocalización de la inmunoreactividad de los receptores TrkB y p75 en retina normal. (A) Expresión de la proteína del receptor TrkB detectada con un anticuerpo secundario rodaminado. (B) Detección de la proteína del receptor p75 evidenciado con un anticuerpo secundario fluoresceinado. (C) Colocalización de la proteína de ambos receptores en la misma sección. Se detectó una señal positiva principalmente en las CGR y CFN. Cierta positividad también fue detectada en CPI, CNI y FTR. CFN: capa de fibras nerviosas, CGR: células ganglionares de la retina, CNI: capa nuclear interna, CPI: capa plexiforme interna, CNE: capa nuclear externa, FTR: capa de fotorreceptores.

En las muestras preparadas de los ojos glaucomatosos no se pudo observar ningún marcaje para el FNDC, TrkB y p75. A través de la microscopía de Nomarski logramos verificar que la ausencia de marcaje en la retina glaucomatosa fue debido a la inexistencia de las estructuras de las diversas capas que forman la retina, debido a que las muestras se encontraban en un estadio muy avanzado de la enfermedad y la retina se encontraba muy degenerada, con la arquitectura desorganizada impidiendo la reacción positiva de los anticuerpos (Fig.5b).

## **2. INMUNOFLUORESCENCIA “IN TOTO”**

En esta técnica fueron analizadas 5 retinas normales y 3 retinas glaucomatosas. En las muestras afectadas las retinas procedieron de perros con un glaucoma temprano.

Los cortes sagitales preparados para la técnica de inmunofluorescencia permitieron observar la presencia del FNDC y de sus receptores TrkB y p75 en las distintas capas de la retina. El propósito de preparar las retinas para la técnica “in toto” fue de visualizar el marcaje del FNDC y la colocalización de los receptores TrkB y p75 en el citoplasma de las células ganglionares de la retina por completo, una vez que el microscopio confocal permite la visualización de la retina en varias secciones ópticas.

Las secciones de retina de los ojos normales presentaron una inmunofluorescencia intensa, positiva, y homogénea al FNDC y a sus receptores TrkB y p75 en el citoplasma de todas las células ganglionares. Las CGR en la retina normal se encuentran más uniformes en tamaño, con núcleo prominente, y aparentemente en una mayor cantidad en la región dorsal de la retina cuando se comparan con la región ventral, observación posible tanto en las muestras positivas al FNDC como para ambos receptores. En las secciones incubadas con el anticuerpo anti-FNDC se observó también un marcaje moderado inespecífico corroborando la presencia de la neurotrofina en las demás capas de la retina como observado en los cortes sagitales (Fig.3). Las secciones procesadas para la colocalización también confirmaron la presencia de los receptores TrkB y p75 en las células ganglionares de la retina con un marcaje uniforme en el citoplasma, así como la intensa fluorescencia del receptor p75 en la capa de fibras nerviosas (Fig.4).

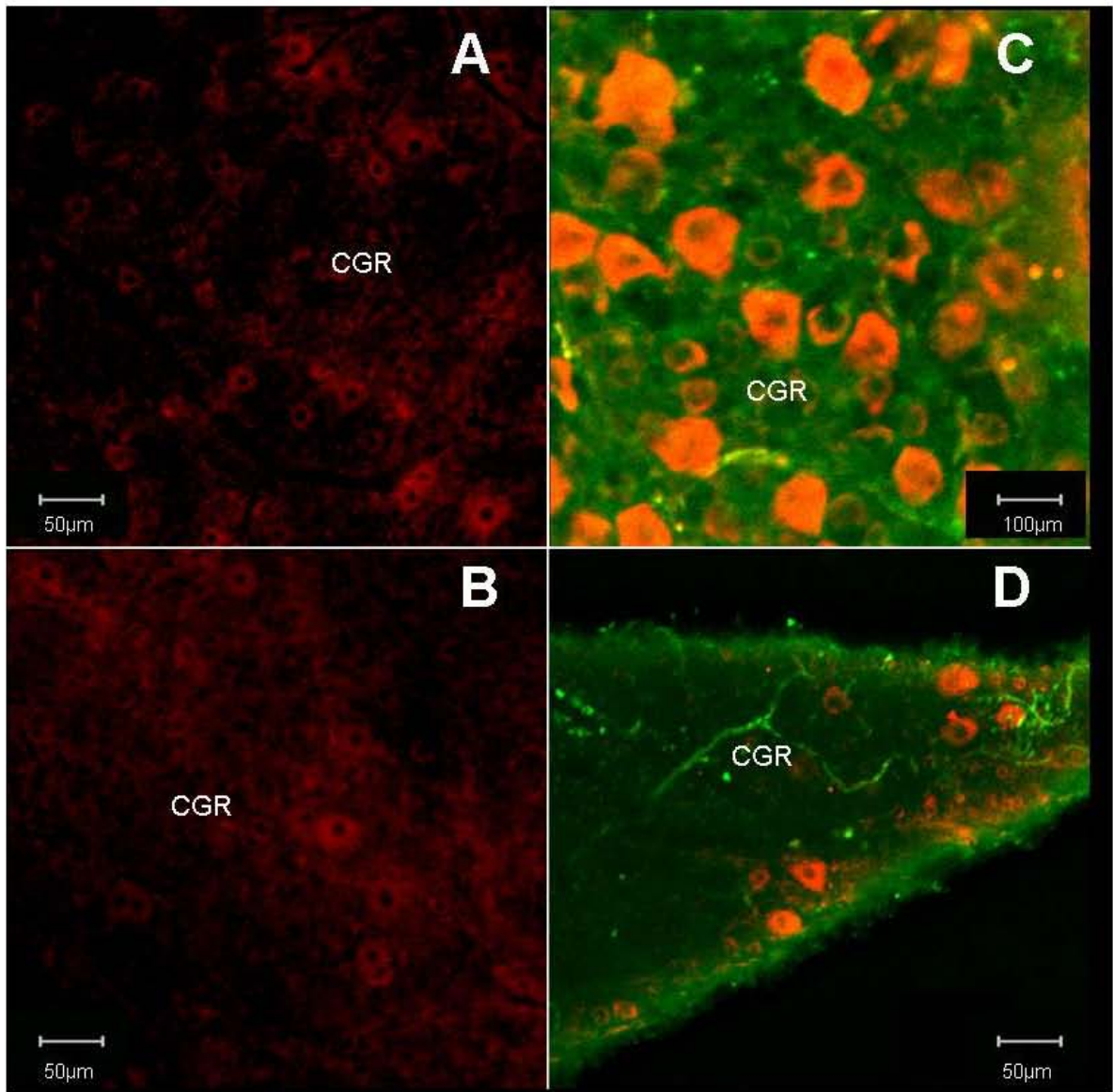


Figura 3. Distribución de la neurotrofina FNDC y sus receptores en retinas normales "in toto". (A,B) Positividad del FNDC en las CGR en las regiones dorsal y ventral, respectivamente. (C,D) Colocalización de los receptores TrkB y p75 en el citoplasma de las CGR en las regiones dorsal y ventral, respectivamente. CGR: células ganglionares de la retina.



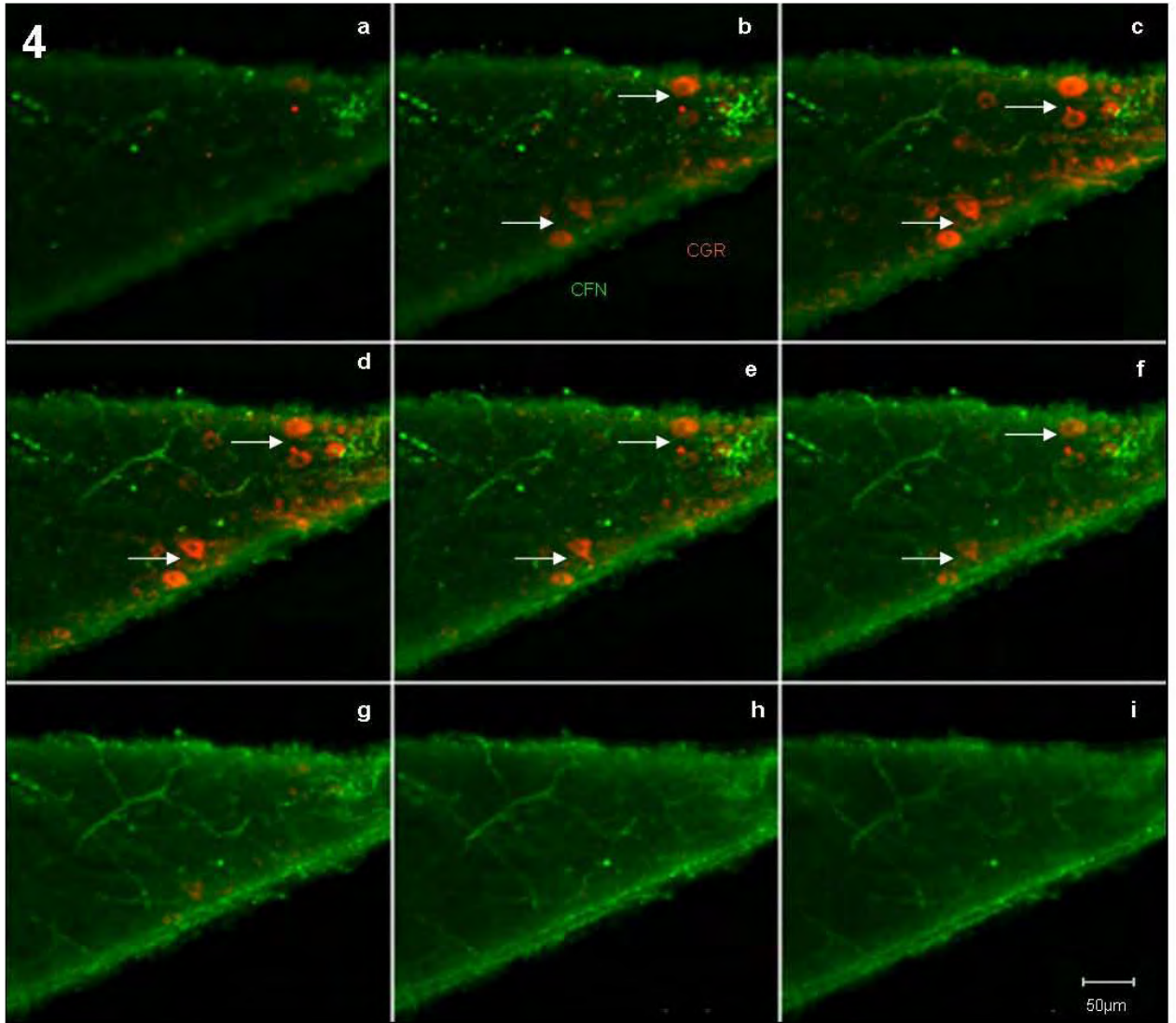


Figura 4. Secciones ópticas de retina normal "in toto" obtenidas en el microscopio confocal. (a): sección más profunda a nivel de la capa plexiforme interna. (i): sección más superficial a nivel de la capa de fibras nerviosas. Se observa la colocalización de los receptores TrkB y p75 en el citoplasma de las CGR (flechas) en diferentes niveles. CFN: capa de fibras nerviosas, CGR: células ganglionares de la retina.

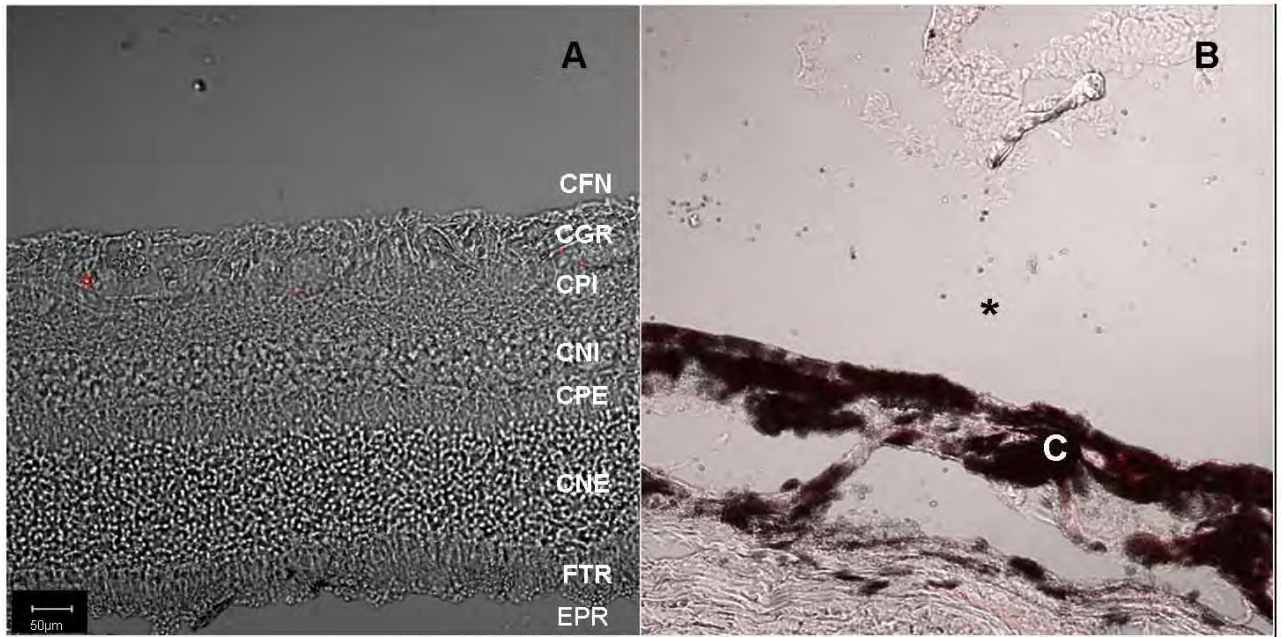


Figura 5. Microscopia de Nomarski de una sección de retina normal (A) y una con glaucoma (B). En condiciones normales, se observan todas las capas que conforman la retina (CFN: capa de fibras nerviosas, CGR: células ganglionares de la retina, CPI: capa plexiforme interna, CNI: capa nuclear interna, CPE: capa plexiforme externa, CNE: capa nuclear externa, FTR: fotorreceptores, y EPR: epitelio pigmentado de la retina. Mientras que en el caso de un glaucoma avanzado no es posible evidenciar las estructuras de las diferentes capas que componen la retina (\*). C: coroides.



La técnica de inmunofluorescencia "in toto" nos permitió comparar las células ganglionares de la retina de los ojos normales y glaucomatosos. Las retinas glaucomatosas estaban más delgadas comparadas a las normales pero igualmente fue posible observar marcaje positivo al FNDC y a los receptores TrkB y p75. En las muestras con glaucoma el FNDC fue detectado de una manera menos homogénea en el citoplasma de las CGR (Fig.6a,6b). La colocación de los receptores en el citoplasma de las CGR fue observado con un patrón igualmente difuso (Fig.6c,6d) además que se observó un marcaje más intenso del receptor p75 en las células de las retinas afectadas comparadas con las normales (Fig.7).

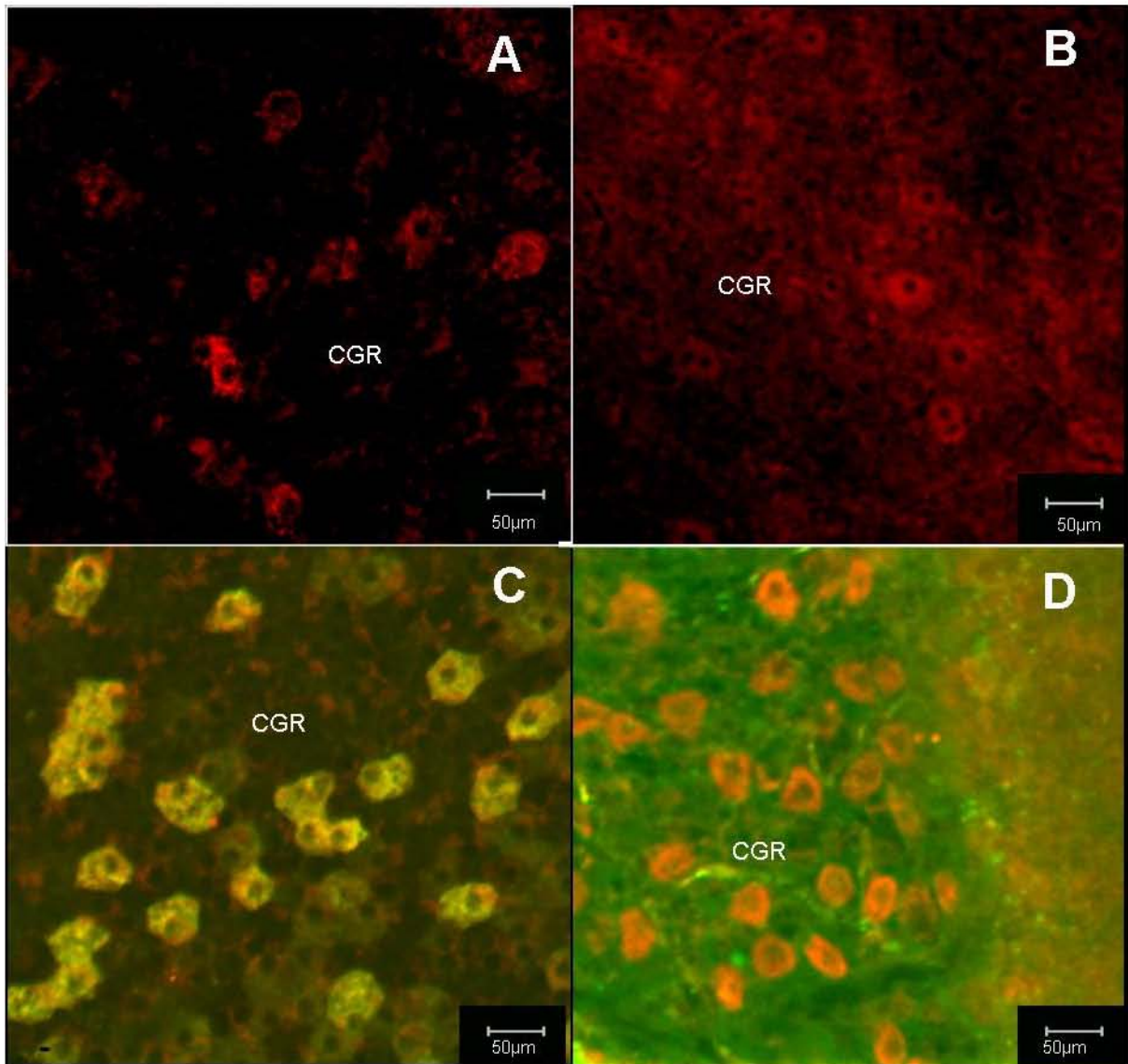


Figura 6. Distribución de la proteína de la neurotrofina FNDC y sus receptores TrkB y p75 en retinas glaucomatosas “in toto”. (A) Positividad del FNDC en las CGR en retina glaucomatosa. (B) Positividad del FNDC en las CGR en retina normal. (C) Colocalización de los receptores TrkB y p75 en las CGR en retina glaucomatosa. (D) Colocalización de los receptores TrkB y p75 en las CGR en retina normal.

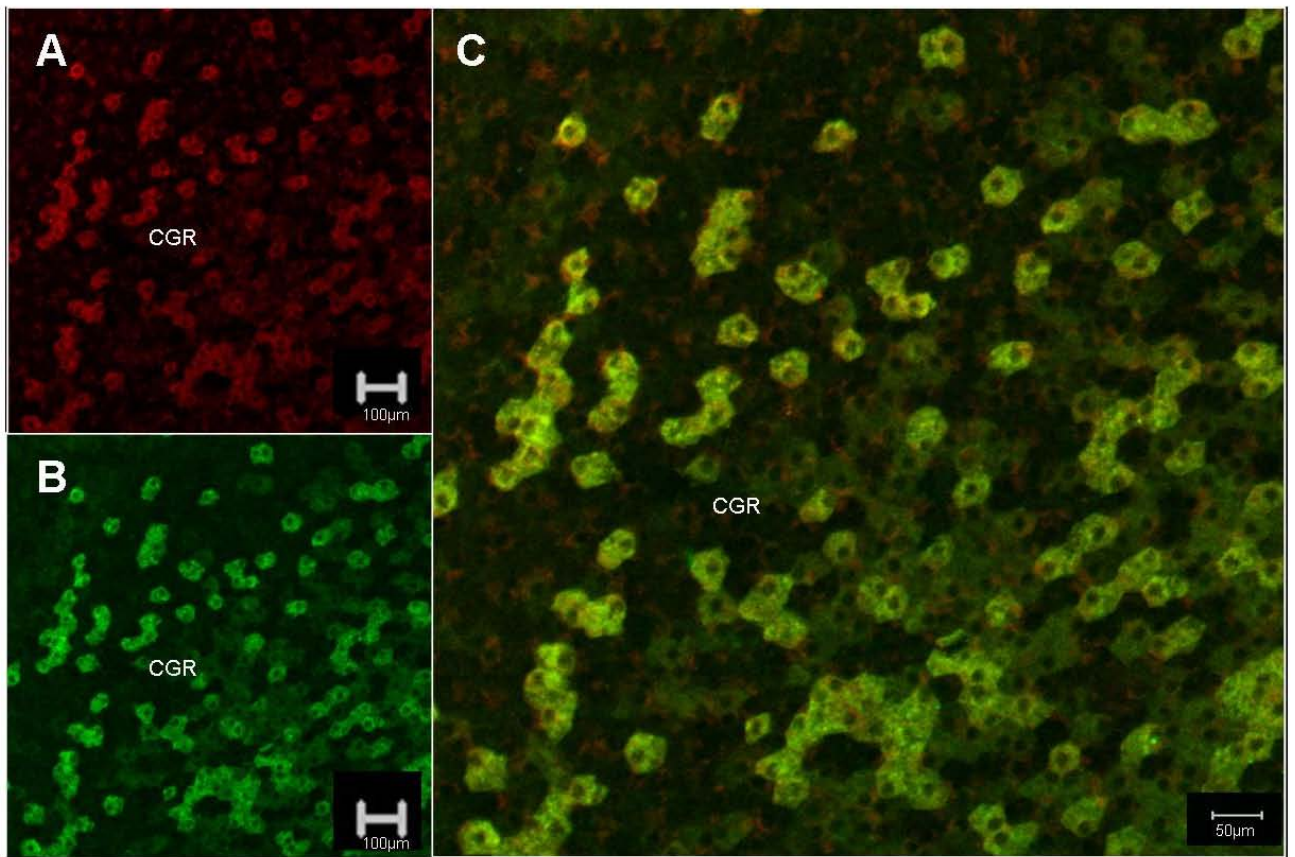


Figura 7. Colocalización de la inmunofluorescencia de los receptores TrkB y p75 en retina glaucomatosa “in toto”. Las secciones de la retina fueron positivas al anticuerpo anti-TrkB revelado con rodamina (A) en combinación con anticuerpo anti-p75 revelado con fluoresceína (B). Se observa la colocalización de ambos receptores en el citoplasma de las CGR (C). CGR: células ganglionares de la retina.

### 3. RT-PCR DE TIEMPO REAL

Utilizando la técnica de RT-PCR de Tiempo Real verificamos la expresión del RNAm del FNDC en 20 ojos normales en las diferentes partes del globo ocular como en la retina dorsal, retina ventral, úvea anterior y vítreo, y comparamos estos valores con el valor encontrado en el cerebro que fue utilizado como calibrador. Observamos una significativa expresión del FNDC en la retina dorsal, retina ventral y vítreo. Sin embargo, no fue observada ninguna expresión de RNAm del FNDC a nivel de la úvea anterior, debido a los valores presentados de Cu igual a 40. Este valor máximo observado de Cu indica una cantidad insuficiente o ausencia de RNA total en la reacción para que ocurra la amplificación. Comparamos también los valores encontrados en la retina dorsal con la retina ventral para verificar si existía alguna diferencia en la expresión del FNDC entre las dos regiones.

Para el análisis del Cu se utilizó la respuesta de diez animales. Donde se observaron valores para la retina dorsal inferiores en el FNDC comparados con los valores del normalizador 18S ( $26.299 \pm 2.358$  y  $27.635 \pm 6.943$  respectivamente). Sin embargo, estos son superiores a los del 18S en retina ventral ( $28.022 \pm 3.636$  y  $24.772 \pm 6.181$  respectivamente), y en el vítreo ( $37.587 \pm 1.793$  y  $31.803 \pm 6.037$  respectivamente). (Cuadro 1). Los valores máximo y mínimo del Cu obtenidos en las distintas regiones para el FNDC y para el normalizador 18S pueden ser observadas en las gráficas 1 y 2.

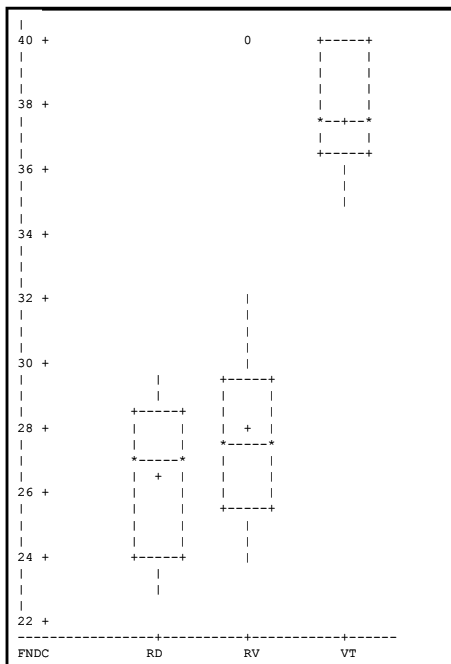
Para el análisis de la expresión del RNAm del FNDC en las distintas regiones del ojo y comparadas con cerebro fueron consideradas todas las muestras (N=20). En el cuadro 2 se muestran los valores centrales expresados a través de la mediana y la variación a partir del rango del RNAm del FNDC calibrada a cerebro, en donde no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la expresión entre las diferentes regiones del ojo  $P > 0.1622$ . (Cuadro 3). Cuando la expresión del RNAm del FNDC en la retina dorsal fue calibrada con los valores observados en la retina ventral, tampoco se encontraron diferencias estadísticas significativas  $P > 0.2897$  entre el ojo izquierdo (mediana =6.22; rango 0.56 – 79.05) y el derecho (mediana=14.32; rango 0-185.28).(Gráfica 3).

Cuadro 1: Valores descriptivos del ciclo umbral del Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro y del normalizador 18S.

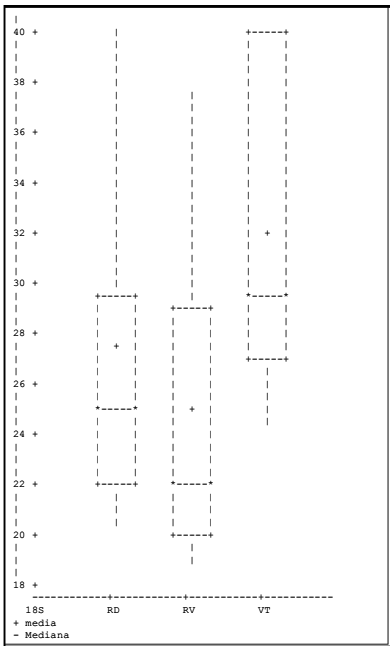
Región	Obs	Variable	Media	Mediana	Error Estándar	Desviación Estándar	Intervalo de Confianza 95%	Coefficiente de Variación %
RD	20	FNDC	26.299	26.890	0.527	2.358	25.195-27.403	8.966
		18S	27.635	25.005	1.553	6.943	24.385-30.884	25.126
RV	20	FNDC	28.022	27.495	0.813	3.636	26.320-29.724	12.977
		18S	24.772	21.845	1.382	6.181	21.879-27.665	24.950
VT	20	FNDC	37.587	37.310	0.401	1.793	36.747-38.426	4.770
		18S	31.803	29.315	1.350	6.037	28.977-34.628	18.982

Obs: número de muestras, RD: retina dorsal, RV: retina ventral, VT: vítreo  
 FNDC: factor neurotrófico derivado del cerebro  
 18S: normalizador 18S ribosomal

Gráfica 1: Gráfica de caja de la dispersión de los valores de ciclo umbral del Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (FNDC) en Retina Dorsal (RD), Retina Ventral (RV), y Vítreo (VT).



Gráfica 2: Gráfica de caja de la dispersión de los valores de ciclo umbral del normalizador 18S en Retina Dorsal (RD), Retina Ventral (RV), y Vítreo (VT).



Cuadro 2: Valores de las medianas y rangos de la expresión del Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro en las distintas regiones especificando ojo derecho e izquierdo al ser comparadas al cerebro.

Ojo/Muestra	Retina Dorsal	Retina Ventral	Vítreo	Mediana
Izquierdo	0.95 (0-55.89)	1.55 (0.01-39)	0.88 (0.01-33.53)	0.95 a
Derecho	2.89 (0.01-139.13)	0.16 (0-4.72)	3.09 (0.12-46.98)	0.89 a
Mediana	1.12 a	0.31 a	1.95 a	0.89

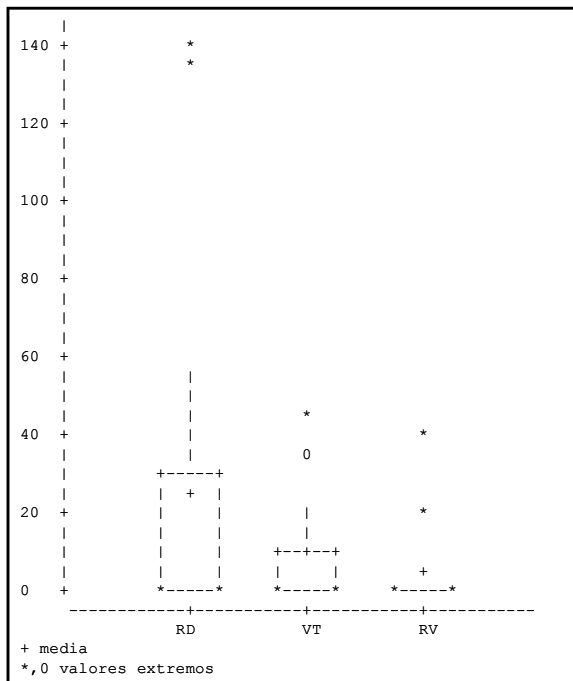
a:  $P < 0.1622$

Cuadro 3: Valores descriptivos de expresión del Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro en las distintas regiones del ojo al ser comparadas al cerebro.

Región	Obs	Variable	Media	Mediana	Error Estándar	Desviación Estándar	Intervalo de Confianza 95 %	Coefficiente de Variación %
RD	19	FNDC	23.761	1.120	9.820	42.804	3.130-44.392	180.141
VT	20	FNDC	8.019	1.950	2.828	12.648	2.099-13.938	157.730
RV	20	FNDC	3.810	0.305	2.078	9.294	-0.540-8.160	243.946

Obs: número de muestras, RD: retina dorsal, RV: retina ventral, VT: vítreo  
 FNDC: factor neurotrófico derivado del cerebro

Gráfica 3: Gráfica de caja de la dispersión de los valores de expresión del Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro en Retina Dorsal (RD), Retina Ventral (RV), y Vítreo (VT).



## **IX - DISCUSIÓN**

Utilizando las técnicas de inmunofluorescencia logramos analizar la presencia del Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (FNDC) y de sus receptores TrkB y p75 en las diversas capas de la retina de perros normales y glaucomatosos; así como cuantificar la expresión del RNAm del FNDC a través de la técnica de RT-PCR de Tiempo Real en las distintas regiones del globo ocular de perros normales.

### **1. INMUNOFLUORESCENCIA**

En este estudio el factor neurotrófico derivado del cerebro (FNDC) y su receptor específico TrkB fueron detectados en varias capas de la retina siendo mucho más intenso en el citoplasma de las células ganglionares de la retina (CGR). Estas observaciones coinciden con estudios realizados en otras especies como peces <sup>(46)</sup>, ratas <sup>(28,39,41,42)</sup> y cerdos <sup>(43)</sup>.

Los factores neurotróficos constituyen una clase de moléculas de proteínas que son considerados como elementos críticos para el desarrollo, mantenimiento, y regeneración del sistema nervioso. En el SNC el FNDC tiene también un papel fundamental en el mantenimiento y regulación del fenotipo morfológico y neuroquímico de las neuronas maduras <sup>(47)</sup>. El FNDC es encontrado principalmente en el hipocampo y en la corteza cerebral, y se sabe que tanto en el sistema nervioso central como en la retina su nivel se mantiene constante durante la etapa adulta <sup>(42)</sup>.

El FNDC es una importante neurotrofina que ha sido demostrada que retarda la pérdida de las CGR posterior a una hipoxia de la retina <sup>(24)</sup>, a una transección del nervio óptico <sup>(25,26)</sup>, y en casos de isquemia <sup>(41)</sup>. Igualmente ha sido reportado que aumenta la supervivencia de los fotorreceptores en casos de degeneración heredada de la retina, a un daño por estímulo constante de luz, así como en casos de desprendimiento experimental de la retina <sup>(29)</sup>. El FNDC también apoya la supervivencia de neuronas en cultivo de embriones de pollo y en cultivos de astrocitos extraídos del cerebro de roedores y de cerdos <sup>(47)</sup>.



El FNDC y su receptor TrkB también fueron detectados de una manera más difusa en la capa de fotorreceptores. Aunque un estudio anterior reporta una localización precisa de ambas proteínas en los conos de la capa de fotorreceptores de ratas, sugiriendo que los bastones no expresan el receptor TrkB y probablemente no responden al FNDC. De esta manera los conos y bastones requerirían de diferentes factores neurotróficos o quizá el FNDC presente en los conos tenga una acción autocrina/paracrina en el mantenimiento de las células de la capa de fotorreceptores <sup>(31)</sup>. Sin embargo, se ha reportado que ratas con enfermedades degenerativas de la retina y que fueron sometidas a una administración intraocular del FNDC favorecen la supervivencia de la población de conos y bastones en la retina adulta <sup>(48)</sup>, así como ratones mutantes nulos para el gen del receptor TrkB completo presentaron alteración en el desarrollo de los bastones por ser esencial la interacción de los bastones con células que expresan el receptor TrkB para el desarrollo normal y maduración de los bastones <sup>(49,50)</sup>.

La forma completa del receptor TrkB fue observado principalmente en las CGR como describen reportes anteriores <sup>(28,46)</sup>. Se conoce la existencia de una forma truncada del receptor TrkB que es extensamente expresada en el cerebro y en neuronas periféricas <sup>(47)</sup>, y en la retina de rata adultas <sup>(28)</sup> y humanos <sup>(51)</sup>. Inclusive se ha observado que esta forma del receptor es particularmente abundante en el sistema nervioso maduro en donde se estima que la forma truncada es encontrada a niveles hasta 10 veces más elevada que la forma catalítica completa de la proteína <sup>(47)</sup>. Algunos estudios proponen la hipótesis que el efecto del FNDC a través del receptor TrkB completo sea reducido por la presencia de la forma truncada en las CGR que expresen ambas formas del receptor. Esta disminución en el efecto sería debido a la formación de heterodímeros no funcionales entre la forma completa y la truncada del receptor TrkB influyendo también en la apoptosis de las CGR en desarrollo <sup>(39)</sup>.

La presencia del receptor p75 ya ha sido reportado en la retinas de ratas <sup>(35,39,41)</sup> y cerdos <sup>(43)</sup>. En la retina de perros normales y glaucomatosos detectamos la presencia del receptor de una manera intensa en la capa de fibras nerviosas y en el citoplasma de las CGR como ya observado en otras especies <sup>(39,43)</sup>, y en retinas en desarrollo de ratas, monos y pollos <sup>(43)</sup>. Aunque, estudios anteriores especifican la localización de este receptor en las células de Müller a través de microscopía electrónica <sup>(35)</sup>, la expresión de

su RNAm ya ha sido reportada en las CGR sugiriendo que el receptor esté involucrado en la apoptosis de las CGR en la etapa de desarrollo <sup>(39)</sup>. Uno de los factores que puede dificultar la localización del receptor a través de la microscopia de luz consiste en que las CGR se encuentran recubiertas de manera muy estrecha por una vaina formada por los procesos de las células de Müller <sup>(43)</sup>. La expresión heterogénea del receptor p75 en las CGR puede ser una de las razones por la que el FNDC no pueda promover la supervivencia de todas las CGR por mucho tiempo posterior a una axotomía <sup>(39)</sup>.

No logramos detectar ningún marcaje en el epitelio pigmentado de la retina (EPR), aunque ya se reportó que el FNDC tiene efectos que promueven la supervivencia de las células del EPR pudiendo tener futuras implicaciones en el tratamiento de enfermedades degenerativas de la retina en humanos como la retinitis pigmentosa <sup>(23)</sup>.

En las retinas glaucomatosas se pudo observar un patrón irregular y difuso en el marcaje del FNDC y de sus receptores en el citoplasma de las CGR. Las células positivas a la colocalización de los receptores TrkB y p75 presentaron un marcaje más intenso del receptor p75 contrastando con el hallazgo en las retinas normales. Una alteración en el patrón normal del receptor TrkB en modelos de glaucoma en ratas y monos ya había sido reportada; sin embargo, evidenciando un aumento del marcaje en las neuronas de las CGR y en la glia. Con la elevación en la PIO, el citoplasma neuronal de las CGR exhibe un marcaje mucho más intenso que en los axones para los anticuerpos TrkB. Este hecho sugiere que podría ser resultado de una disminución en la proteólisis del receptor, una falla en los receptores sintetizados, un incremento en la producción de los receptores o un incremento en la llegada de los receptores que provienen de la terminal del axon <sup>(28)</sup>.

Se sabe que las CGR adultas sintetizan neurotrofinas, exhiben los receptores de TrkB y responden al FNDC, aunque existan otras fuentes de suministro para esta y otras neurotrofinas <sup>(5,42)</sup>. Como los fotorreceptores, las células amácrinas y algunas células bipolares son sensibles al FNDC, es razonable asumir que estas células puedan tener la capacidad de sintetizar el FNDC <sup>(44)</sup>. La observación del FNDC en las células de Müller sugiere que estas células puedan también ser fuente de neurotrofinas para la retina bajo condiciones fisiológicas y patológicas <sup>(42)</sup>. La presencia del FNDC y su receptor TrkB en estructuras no neuronales como la lámina cribosa <sup>(52)</sup>, la malla trabecular <sup>(53)</sup>, y la glándula

lacrimal <sup>(54)</sup>, indica que células no neuronales también son capaces de sintetizar y expresar las neurotrofinas y sus receptores.

## 2. RT-PCR DE TIEMPO REAL

Logramos cuantificar la expresión del RNAm del FNDC en la retina, úvea anterior y vítreo de ojos de perros normales. La expresión de esta neurotrofina en las células ganglionares de la retina ya había sido reportada en varias especies <sup>(28,44,46,33,55)</sup>. En el cerebro y en el SNC se co-expresa el FNDC y su receptor TrkB, aunque ni todas las neuronas que expresan el RNAm de los receptores expresan el RNAm de sus ligandos sugiriendo la existencia de un mecanismo autocrino. Por otra parte algunas neuronas expresan más de una neurotrofina por la distribución observada del RNAm indicando el papel específico que tiene cada neurotrofina como en la maduración temprana de las neuronas y en la supervivencia neuronal tardía <sup>(56)</sup>.

Como se esperaba, detectamos la expresión del RNAm del FNDC en la retina por tratarse de la parte neural del ojo; sin embargo no se detectó ninguna expresión en la úvea anterior probablemente debido a la baja cantidad de RNA total en esta región del ojo o la ausencia de expresión de la neurotrofina, aunque ya han reportado la expresión del RNAm del FNDC en el iris <sup>(25)</sup>.

La presencia del RNAm del FNDC en la retina de perros normales adultos confirma que esta neurotrofina tiene un papel muy importante en el desarrollo de la retina, pero que también es esencial en el funcionamiento normal de las células maduras de la retina <sup>(44,57)</sup>. La observación de diferentes niveles de expresión de la proteína y del RNAm del FNDC en la retina sugiere que exista una síntesis local de la neurotrofina <sup>(42)</sup>. Además las neuronas en el colículo superior también expresan el RNAm del FNDC, indicando la existencia de un transporte retrógrado de la neurotrofina hacia las CGR <sup>(58)</sup>. Como es un factor trófico importante en la supervivencia de las CGR durante el desarrollo y en el estudio de enfermedades, es lógico pensar que una elevación en la PIO podría actuar para disminuir la salud de las CGR <sup>(29)</sup>, debido a que experimentos con FNDC marcado en el colículo superior muestra que el movimiento axonal de neurotrofinas es sustancialmente disminuido y hasta inhibido por la elevación de la PIO <sup>(28,29)</sup>.

En un estudio anterior se sugiere que las señales de fuentes endógenas del FNDC como las neuronas del colículo superior y del cuerpo geniculado lateral pueden ser interrumpidos en el glaucoma, afectando de esta manera la acción de esta neurotrofina en la supervivencia de las CGR <sup>(29)</sup>. Se ha observado que el FNDC exógeno induce la extensión de los procesos de las CGR, soporta la supervivencia de las CGR en desarrollo, así como retrasa y parcialmente previene la degeneración de las CGR maduras. Si la viabilidad de las CGR durante etapas tempranas del desarrollo es determinado por los niveles del FNDC, entonces el hecho de que estas células sean capaces de producir el FNDC sugiere que la supervivencia de las CGR no depende sólo de las neurotrofinas derivadas de las células blanco, sino también de neurotrofinas producidas localmente <sup>(44)</sup>. La observación de la expresión del FNDC por células ganglionares de la retina en cultivo corrobora la acción autocrina de la neurotrofina <sup>(43)</sup>. Otro estudio propone que el receptor p75 actúa entregando la neurotrofina-3 (NT-3) de los cuerpos celulares a las terminales de los axones por acción anterógrada, y transporta el FNDC de las terminales de los axones a los cuerpos celulares por mecanismo retrógrado <sup>(59)</sup>. La observación de la expresión del RNAm del FNDC en el vítreo, componente gelatinoso que ocupa la parte posterior del globo ocular sugiere una posible participación en el mecanismo autocrino/paracrino de las neurotrofinas.

Estudios realizados en modelos experimentales con glaucoma sugieren que los receptores TrkB están bloqueados a nivel de la cabeza del nervio óptico demostrando su transporte axonal a través de las fibras del nervio óptico <sup>(28)</sup>, sustentando la hipótesis que las acciones tróficas de los receptores kinase que median los mecanismos en las CGR pueden ser un importante componente en el camino de la lesión axonal a la muerte celular <sup>(29)</sup>.

Hallazgos recientes sugieren la posibilidad de que la manipulación en la expresión de las isoformas de los receptores TrkB y p75 incrementa los efectos del FNDC en la supervivencia de las CGR <sup>(39)</sup>, una vez que una mayor expresión del receptor TrkB truncado puede auxiliar en el incremento del nivel del FNDC para mejor interacción con la forma completa del receptor TrkB <sup>(53)</sup>. La colocalización de neurotrofinas y de receptores dentro de una misma población celular apoya la posibilidad de una interacción paracrino/autocrino de las neurotrofinas, indicando que la viabilidad de las CGR está

determinado por niveles del FNDC derivado de las células blanco, así como del FNDC producido localmente <sup>(60)</sup>.

Las proteínas y el RNAm de las neurotrofinas han sido detectadas en las células de sostén de las neuronas periféricas (células de Schwann y fibroblastos) implicando un posible papel en la regeneración y remodelación de los nervios. Una vez que la expresión de las neurotrofinas es observada principalmente en las neuronas cerebrales, la presencia en la periferia sugiere una acción paracrina y autocrina en el mantenimiento de las neuronas maduras <sup>(47)</sup>. La existencia de un mecanismo de acción autocrino/paracrino de las neurotrofinas es además observada en tejidos no-neuronales <sup>(54,61)</sup>, siendo que esta capacidad de expresar y/o responder a las neurotrofinas sea debido al origen embrionaria a partir de la cresta neural <sup>(53)</sup>.

### **3. NEUROPROTECCIÓN**

Diversos estudios reportan que el FNDC puede ser utilizado en terapias para el tratamiento de diversas enfermedades de la retina. A través de aplicaciones intravítreas de la proteína FNDC es posible aumentar la supervivencia de las CGR posteriores a una transección del nervio óptico <sup>(25,62)</sup>. El empleo de la electroporación agregado a la inyección intravítrea del gen del FNDC <sup>(63)</sup>, así como inyecciones intravítreas del gen del FNDC utilizando adenovirus como vectores <sup>(64,65,66)</sup> han auxiliado en la disminución del porcentaje de apoptosis y auxiliado en la supervivencia de las células de la retina. Sin embargo, se ha observado que dosis elevadas del FNDC inducen a una inflamación de la retina resultando en una disminución en la supervivencia del número total de CGR <sup>(26)</sup>. Otro estudio reporta una efectividad limitada del FNDC, en donde dosis elevadas de la neurotrofina no demostraron aumentar la supervivencia celular sino más bien inducir negativamente los niveles del receptor TrkB completo <sup>(67)</sup>.

Es necesaria una mejor comprensión de la interacción entre el FNDC y su receptor TrkB antes de considerar al FNDC como única fuente en la terapia de neuroprotección de las enfermedades oculares. Esto debido a un estudio realizado con ratones mutantes nulos para el FNDC y el receptor TrkB, en el cual se reporta que aunque los mecanismos

celulares que controlan la dinámica de la muerte de las CGR durante el desarrollo sea FNDC/TrkB dependiente, se considera que aquellos mecanismos que regulan el número final de las CGR sean FNDC/TrkB independientes <sup>(40)</sup>.

El término neuroprotección es aplicado en condiciones como la neuropatía glaucomatosa que empieza como una lesión axonal, y principalmente implica que los cuerpos celulares de los axones dañados serán protegidos y de esta manera aumentar su tasa de supervivencia <sup>(68)</sup>. Por supuesto que esto no se aplica para las neuronas cuyos axones ya se encuentran con daños irreversibles. El principal objetivo en la neuroprotección es rescatar a aquellos axones que no fueron dañados directamente por las causas primarias de la enfermedad, pero que pasarían por degeneraciones secundarias como resultado de la liberación y propagación de sustancias nocivas derivadas de la lesión primaria, además de aumentar los mecanismos de supervivencia de las CGR <sup>(68,69)</sup>. Esta protección permitiría que los axones vecinos inicialmente intactos mantuvieran su integridad y su función.

La terapia en la neuropatía glaucomatosa debe de incluir la inducción de la regeneración de las neuronas que tengan dañados sus axones antes que su cuerpo celular se atrofie. Un tratamiento combinado de la neuroprotección con la neuroregeneración debe de ser considerada. La terapia génica utilizando los factores neurotróficos involucrados en la neuropatía glaucomatosa <sup>(70)</sup> transplantados a células genéticamente modificadas tiene el potencial de suministrar neurotrofinas biológicamente producidas a las células de la retina. El trasplante intraocular por medio de un vector de estas células genéticamente modificadas que tengan la capacidad de producir el FNDC es un acercamiento prometedor en la entrega a largo plazo de neurotrofinas a las células de la retina que puedan contrarrestar las neurotrofinas deficientes relacionadas a la degeneración y apoptosis de las CGR durante el glaucoma promocionando la recuperación funcional de las neuronas <sup>(64,71,72)</sup>. Finalmente, en un futuro no muy lejano la posibilidad de la utilización de células troncales en la reconstitución de las CGR perdidas puede ser un poderoso método en la reparación de efectos hasta entonces irreversibles en el glaucoma <sup>(69)</sup>.

En los últimos años ha habido un gran interés en modelos animales para el estudio del glaucoma debido a que esto permite nuevos acercamientos en la protección de las CGR que auxiliarían en la preservación de la visión en los casos del glaucoma humano. Muchos modelos animales de glaucoma han sido desarrollados en monos, ratas y ratones <sup>(73)</sup> para el estudio de la fisiopatología del glaucoma; sin embargo ningún modelo experimental canino ha sido desarrollado hasta el momento. Con base en todos estos conocimientos y con nuevas estrategias terapéuticas involucrando la neuroprotección, la neuroregeneración y los modelos animales será posible el desarrollo de mejores tratamientos y más eficaces a los pacientes de todas las especies que sufren de glaucoma.

## **X - CONCLUSIÓN**

En la retina de perros normales logramos determinar el patrón de expresión de la proteína del FNDC en las células ganglionares de la retina (CGR), en la capa de fotorreceptores, capa nuclear externa (CNE), capa plexiforme externa (CPE), y en la capa de fibras nerviosas (CFN). La colocalización de los receptores TrkB y p75 fue detectada de forma intensa en el citoplasma de las CGR, y moderadamente en la capa de fotorreceptores, CNI, y CFN, y estuvieron de acuerdo al marcaje observado en la inmunofluorescencia de los receptores en separado. En las retinas glaucomatosas la expresión de la proteína del FNDC y la colocalización de los receptores fueron detectadas de una manera irregular y difusa en el citoplasma de las CGR.

Logramos además medir los niveles del RNAm del Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (FNDC) en retinas normales por medio de la RT – PCR de Tiempo Real. Observamos una significativa expresión del FNDC en la retina dorsal, retina ventral y vítreo, aunque no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la expresión entre las diferentes regiones del ojo. Además, no observamos ninguna expresión de RNAm del FNDC a nivel de la úvea anterior (iris y cuerpo ciliar).



## XI - ANEXOS

Anexo 1: Expresión del Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro en diferentes partes del ojo comparadas con el cerebro.

		RETINA DORSAL	RETINA VENTRAL	CUERPO CILIAR	VITREO	CEREBRO
PERRO 1	OJO DERECHO	4.65	0.03	S/E (40)	0.55	1
	OJO IZQUIERDO	55.83	1.63	S/E (40)	9.57	1
PERRO 2	OJO DERECHO	139.13	0.87	S/E (40)	46.98	1
	OJO IZQUIERDO	21.33	3.26	S/E (40)	33.53	1
PERRO 3	OJO DERECHO	10.05	1.05	S/E (40)	2.96	1
	OJO IZQUIERDO	9.98	0.13	S/E (40)	0.53	1
PERRO 4	OJO DERECHO	0.59	0.15	S/E (40)	3.21	1
	OJO IZQUIERDO	0.95	1.47	S/E (40)	0.82	1
PERRO 5	OJO DERECHO	1.12	0.44	S/E (40)	21.66	1
	OJO IZQUIERDO	658.45	18.76	S/E (40)	0.94	1
PERRO 6	OJO DERECHO	133.65	0	S/E (40)	0.12	1
	OJO IZQUIERDO	0.53	0.09	S/E (40)	0.02	1
PERRO 7	OJO DERECHO	41.2	0.01	S/E (40)	14	1
	OJO IZQUIERDO	31.48	39	S/E (40)	5	1
PERRO 8	OJO DERECHO	0.01	0.03	S/E (40)	0.73	1
	OJO IZQUIERDO	0.01	0.01	S/E (40)	0.33	1
PERRO 9	OJO DERECHO	0.9	4.72	S/E (40)	0.67	1
	OJO IZQUIERDO	0.04	4.34	S/E (40)	0.01	1
PERRO 10	OJO DERECHO	0.01	0.17	S/E (40)	6.71	1
	OJO IZQUIERDO	0	0.04	S/E (40)	12.03	1

S/E: sin expresión del RNAm

Anexo 2: Expresión el Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro comparando retina dorsal y ventral del mismo ojo.

		RETINA DORSAL CON VENTRAL			RETINA DORSAL CON VENTRAL
PERRO 1	OJO DERECHO	185.28	PERRO 6	OJO DERECHO	38.2
	OJO IZQUIERDO	34.21		OJO IZQUIERDO	5.89
PERRO 2	OJO DERECHO	159.18	PERRO 7	OJO DERECHO	167.99
	OJO IZQUIERDO	6.54		OJO IZQUIERDO	0.81
PERRO 3	OJO DERECHO	9.56	PERRO 8	OJO DERECHO	0
	OJO IZQUIERDO	79.05		OJO IZQUIERDO	50
PERRO 4	OJO DERECHO	3.96	PERRO 9	OJO DERECHO	19.07
	OJO IZQUIERDO	0.64		OJO IZQUIERDO	0.81
PERRO 5	OJO DERECHO	2.53	PERRO 10	OJO DERECHO	7.63
	OJO IZQUIERDO	35.1		OJO IZQUIERDO	0.56

## XII – REFERENCIAS

- 1 – Gelatt KN, Brooks DE, Samuelson DA. Comparative glaucomatology I: The spontaneous glaucomas. *J. Glaucoma* 1998; 7: 187-201.
- 2 – Brooks DE, Garcia-Sanchez GA, Dreyer EB, Zurakowski D, Franco-Bourland RE. Vitreous body glutamate concentration in dogs with glaucoma. *Am J Vet Res* 1997; 58: 864-867.
- 3 – Renwick P. Diagnosis and management of glaucoma *In. Prac.* 1993; 17: 10-20.
- 4 – Gelatt KN, Brooks DE. The canine glaucomas. – Gellat K.N. ed *Textbook of veterinary ophthalmology* 3<sup>rd</sup> ed. Philadelphia: Williams and Williams, 1999; 701-754.
- 5 – Brooks DE. Glaucoma in the dog and cat. *Vet Clin North Am* 1990; 20: 775-797.
- 6 – Brooks DE, Komaromy AM, Källberg ME. Comparative optic nerve physiology: implications for glaucoma, neuroprotection and neuroregeneration. *Vet Ophthalmol* 1999; 2: 13-25.
- 7 – Gelatt KN, Brooks DE. Anatomy. – Gellat K.N. ed *Textbook of veterinary ophthalmology* 3<sup>rd</sup> ed. Philadelphia: Williams and Williams, 1999;
- 8 – Slatter D. Glaucoma – *Fundamentals of veterinary ophthalmology*. 2<sup>nd</sup> ed. W.B.Saunders company, 1990; 338-364.
- 9 – Brooks DE, Dzizyc JD. The canine glaucomas. Pathogenesis, diagnosis and treatment. *Comp Cont Educ* 1983; 5: 292-301.
- 10 – Gelatt KN, Brooks DE, Samuelson DA. Comparative glaucomatology II: The spontaneous glaucomas. *J. Glaucoma* 1998; 7: 282-294.
- 11 – Garcia-Sanchez GA, Brooks DE, Gelatt KN, Kubilis PS, Gil-Carrasco F, Whitley RD. Evaluation of valved and nonvalved gonioimplants in 83 eyes of 65 dogs with glaucoma.

*Anim Eye Res* 1998; 17: 9-16.

- 12 – Garcia-Sanchez GA, Gil-Carrasco F, Rodriguez-Bazan SA, Rivera A, Braga-Martins AL, Brooks DE. Measurement of retinal nerve fiber layer thickness in normal and glaucomatous dogs with the Nerve Fiber Analyzer. *Proc Am Coll Vet Ophth, 32th Annual Meet.* 2001.
- 13 – Brooks DE, Komaromy AM, Källberg ME. Comparative retinal ganglion cell and optic nerve morphology. *Vet Ophthalmol* 1999; 2: 3-11.
- 14 - Fechtner RD, Weinreb MD. Mechanisms of optic nerve damage in primary open angle glaucoma. *Surv of Ophthmol* 1994; 39: 23-42.
- 15 – Rennberg M, Ammitzböll T, Tengroth B. Collagen distribution in the lamina cribosa and the trabecular meshwork of the human eye. *Brit J Ophthalmol* 1986; 71: 886-892.
- 16 – Hernandez MR, Luo XX, Igoe F, Neufeld AH. Extracellular matrix of the human lamina cribosa. *Am J Ophthalmol.* 1987; 104: 567-576.
- 17 – Brooks D, Samuelson D, Gelatt K, Smith P. Morphologic changes in the lamina cribrosa of Beagles with primary open-angle glaucoma. *Am J Vet Res.* 1989; 50: 936-941.
- 18 – Williams LW, Gelatt KN, Gum GG, Samuelson DA, Merideth RE. Orthograde rapid axoplasmic transport and ultrastructural changes of the optic nerve. Part I. Normotensive and acute ocular hypertensive Beagles. *Glaucoma.* 1983; 5: 117-128.
- 19 – Hernandez MR, Pena J. The optic nerve head in glaucomatous optic neuropathy. *Arch Ophthalmol* 1997; 115: 389-395.
- 20 – Rosenfeld RD, Zeni L, Haniu M, Talvenheimo S, Radka SF, Bennett L, Miller JA, Welcher AA. Purification and identification of brain derived neurotrophic factor from human serum. *Prot Exp Purif* 1995; 6: 465-471.

- 21 - Croll S, Nancy Y. Expression of BDNF and TrkB as a function of age and cognitive performance. *Brain Res* 1998; 812: 200-208.
- 22 – Barde YA, Davies AM, Johnson JE, Lindsay RM, Thoenen H. Brain derived neurotrophic factor. *Prog Brain Res* 1987; 71: 185-189.
- 23 – Liu ZZ, Zhu LQ, Eide FF. Critical role of TrkB and brain derived neurotrophic factor in the differentiation and survival of retinal pigment epithelium. *J Neurosci* 1997; 17(22): 8749-8755.
- 24 - Ikeda K, Tanihara H, Honda Y, Tatsuno T, Noguchi H, Nakayama Ch. BDNF attenuates retinal cell death caused by chemically induced hypoxia in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40(9): 2130-2140.
- 25 – Mansour-Robaey S, Clarke DB, Wang Y, Bray GM, Aguayo AJ. Effects of ocular injury and administration of brain-derived neurotrophic factor on survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells. *Proc Natl Acad Sci* 1994; 91: 1632-1636.
- 26 – Chen H, Weber AJ. BDNF enhances retinal ganglion cell survival in cats with optic nerve damage. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42(5): 966-974.
- 27 – Johnson EC, Deppmier L, Wentzien SK, Morrison JC. Chronology of optic nerve head and retinal responses to elevated intraocular pressure. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41(2): 431-446.
- 28– Pease ME, McKinnon SJ, Quigley HA, Kerrigan-Baumrind LA, Zack DJ. Obstructed axonal transport of BDNF and its receptor TrkB in experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41(3): 764-774.
- 29 – Quigley HA, McKinnon SJ, Zack DJ, Peasa ME, Kerrigan-Baumrid LA, Kerrigan DF, Mitchell RS. Retrograde axonal transport of BDNF in retinal ganglion cell is blocked by acute IOP elevation in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41(11): 3460-3466.
- 30 – Naskar R, Vorwerk ChK, Dryer EB. Concurrent downregulation of glutamate transporter

and receptor in glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41(7): 1940-1943.

- 31 – Di Polo A, Cheng L, Bray MG, Aguayo AJ. Colocalization of TrkB and Brain-Derived Neurotrophic Factor proteins in green-red sensitive cone outer segments. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41(12): 4014-4021.
- 32 – Barbacid M. The Trk family of neurotrophin receptors. *J Neurobiol* 1994; 25 (11): 1386-1403.
- 33 - Jelsma TN, Hyman H, Berkelaar M, et al. Different forms of the neurotrophin receptor trkB mRNA predominate in rat retina and optic nerve. *J Neurobiol* 1993; 24: 1207-1214.
- 34 – Tapley P, Lamballe F, Barbacid M. K252a is a selective inhibitor of the tyrosine protein kinase activity of the trk family of oncogenes and neurotrophin receptor. *Oncogene* 1992; 7: 371-381.
- 35 – Hu B, Yip KH, So KF. Localization of p75 neurotrophin receptor in the retina of the adult SD rat: an immunocytochemical study at light and electron microscopy levels. *Glia* 1998; 24: 187-197.
- 36 - Barker PA, Murphy RA. The nerve growth factor receptor: a multicomponent system that mediates the actions of the neurotrophin family of proteins. *Mol Cell Biochem* 1992; 110: 1-15.
- 37 – Carmignoto G, Comelli MC, Candeo P, Cavicchioli L, Yan Q, Merichi A, Maffei L. Expression of NGF receptor and NGF receptor mRNA in the development and adult rat retina. *Exp Neurol* 1991; 111: 302-311.
- 38 – Chakrabarti S, Sima AAF, Lee J, Brachet P, Dicou E. Nerve growth factor (NGF), proNGF and NGF receptor like immunoreactivity in BB rat retina. *Brain Res* 1990; 523: 11-15.
- 39 – Suzuki A, Nomura S, Morii E, Fukuda Y, Kosaka J. Localization of mRNAs for TrkB isoforms and p75 in rat retina ganglion cells. *J Neurosci Res* 1998; 54(1): 27-37.

- 40 – Pollock GS, Robichon R, Boyd KA, Kerkel KA, Kramer M, Lyles J, Ambalavanar R, Khan A, Kaplan DR, Williams RW, Frost DO. TrkB receptor signalling regulates developmental death dynamics, but not final number, of retinal ganglion cells. *J Neuroscience* 2003; 23: 10137-10145.
- 41 - Vecino E, Caminos E, et al. Immunohistochemical distribution of neurotrophins and their receptors in the rat retina and the effects of ischemia and reperfusion. *Gen Pharmac* 1998; 30: 305-314.
- 42 – Seki M, Nawa H, Fukuchi T, Abe H, Takei N. BDNF is upregulated by postnatal development and visual experience: quantitative and immunohistochemical analyses of BDNF in the rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44: 3211-3218.
- 43 – García M, Forster V, Hicks D, Vecino E. In vivo expression of neurotrophins and neurotrophin receptors is conserved in adult porcine retina in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44: 4532-4541.
- 44 – Perez MT, Caminos E. Expression of brain-derived neurotrophin factor and of its functional receptor in neonatal and adult rat retina. *Neurosci Lett* 1995; 183(1-2): 96-99.
- 45 – Slatter D. Orbit – *Fundamentals of veterinary ophthalmology*. 2<sup>nd</sup> ed. W.B.Saunders company, 1990; 478-511.
- 46 - Caminos E, Becker E, Martin-Zanca D, Vecino E. Neurotrophins and their receptors in the tench retina during optic nerve regeneration. *J Comp Neurol* 1999; 404: 321-331.
- 47 - Lindsay RM. Role of neurotrophins and TrK receptor in the development and maintenance of sensory neurons: an overview. *Phil Trans R Soc Lond B* 1996; 351: 365-373.
- 48 – LaVail MM, Yasumura D, Matthes MT, Lau-Villacorta C, Unoki K, Sung CH, Steinberg RH. Protein of mouse photoreceptors by survival factors in retinal degenerations. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; 39: 592-602.

- 49 – Rohrer B, Ogilvie JM. Retarded outer segment development in TrkB knockout mouse retina organ culture. *Mol Vis* 2003; 9: 18-23.
- 50 – Rohrer B, Korenbrot JI, LaVail MM, Reichardt LF, Xu B. Role of neurotrophin receptor TrkB in the maturation of rod photoreceptor and establishment of synaptic transmission to the inner retina. *J Neuroscience* 1999; 19: 8919-8930.
- 51 – Haniu M, Montestrucque S, Bures EJ, Talvenheimo J, Toso R, Lewis-Sandy S, Welcher AA, Rohde MF. Interactions between brain-derived neurotrophic factor and the TrkB receptor. *J Biologic Chem* 1997; 272(40): 25296-25303.
- 52- Lambert W, Agarwal R, Howe W, et al. Neurotrophin and neurotrophin receptor expression by cells of the human lamina cribosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42: 2315-2322.
- 53 – Wordinger RJ, Lambert W, Agarwal R, Talati M, Clark AF. Human trabecular meshwork cells secrete neurotrophins and express neurotrophin receptors (Trk). *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41: 3833-3841.
- 54 – Ghinelli E, Johansson J, Ríos JD, Chen LL, Zoukhri D, Hodges RR, Dartt DA. Presence and localization of neurotrophins and neurotrophin receptors in rat lacrimal gland. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44: 3352-3357.
- 55 – Ugolini G, Cremisi F, Maffei L. TrkA, TrkB and p75 mRNA expression is developmentally regulated in the rat retina. *Brain Res* 1995; 704: 121-124.
- 56 – Miranda RC, Sohrabji F, Toran-Allerand D. Neuronal colocalization on mRNAs for neurotrophins and their receptors in the developing central nervous system suggests a potential for autocrine interactions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 6439-6443.
- 57 – Bennett JL, Steven RZ, Jones KR. Patterned expression of BDNF and NT-3 in the retina and anterior segment of the developing mammalian eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40: 2996-3005.

- 58 – Conner JM, Lauterborn JC, Yan Q, Gall CM, Varon S. Distribution of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein and mRNA in the normal adult rat CNS: evidence for anterograde axonal transport. *J Neuroscience* 1997; 17: 2295-2313.
- 59 – Herzog KH, Bailey K, Barde YA. Expression of the BDNF gene in the developing visual system of the chick. *Development* 1994; 120: 1643-1649.
- 60 - Davies A. Paracrine and autocrine actions of neurotrophic factors. *Neurochem Res* 1996; 21: 749-753.
- 61 – You L, Kruse FE, Völcker HE. Neurotrophic factors in the human cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41: 692-702.
- 62 – Berkelaar M, Clark DB, Wang YC, Bray GM, Aguayo AJ. Axotomy results in delayed death and apoptosis of retinal ganglion cells in adult rats. *J Neuroscience* 1994; 14: 4368-4374.
- 63 – Mo X, Yokoyama A, Oshitari T, Negishi H, Dezawa M, Mizota A, Adachi-Usami E. Rescue of axotomized retinal ganglion cells by BDNF gene electroporation in adults rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43: 2401-2405.
- 64 – Martin KR, Quigley HA, Zack DJ, Levkovitch-Verbin H, Kielczewski J, Valenta D, Baumrind L, Pease ME, Klein RL, Hauswirth WW. Gene therapy with brain-derived neurotrophic factor as a protection retinal ganglion cells in a rat glaucoma model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44 (10): 4357-4365.
- 65– Di Polo A, Aigner LJ, Dunn RJ, Bray GM, Aguayo AJ. Prolonged delivery of brain-derived neurotrophic factor by adenovirus-infected Müller cells temporarily rescues injured retinal ganglion cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 3978-3983.
- 66 – Hojo M, Abe T, Sugano E, Yoshioka Y, Saigo Y, Tomita H, Wakusawa R, Tamai M. Photoreceptor protection by iris pigment epithelial transplantation transduced with AAV-mediated brain-derived neurotrophic factor gene. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45:



3721-3726.

- 67 – Chen H, Weber AJ. Brain-derived neurotrophic factor reduces TrkB protein and mRNA in the normal retina and following optic nerve crush in adult rats. *Brain Res* 2004; 1011: 99-106.
- 68 – Schwartz M, Belkin M, Yoles E, Solomon A. Potential treatment modalities for glaucoma neuropathy: neuroprotection and neuroregeneration. *J Glaucoma* 1996; 5: 427-432.
- 69 - Weinreb RN, Levin LA. Is neuroprotection a viable therapy for glaucoma? *Arch Ophthalmol* 1999; 117: 1540-1544.
- 70 - Naskar R, Dreyer EB. New horizons in neuroprotection. *Survey Ophthalmol* 45: 250.272.
- 71 – Wang N, Zeng M, Ruan Y, Wu H, Chen J, Fan Z, Zhen H. Protection of retinal ganglion cells against glaucomatous neuropathy by neurotrophin producing, genetically modified neural progenitor cells in a rat model. *Chin Med J* 2002; 115 (9): 1394-1400.
- 72 – Martin KRG, Quigley HA. Gene therapy for optic nerve disease. *Eye* 2004; 18: 1049-1055.
- 73 – Levkovitch-Verbin H. Animal models of optic nerve disease. *Eye* 2004; 18: 1066-1074.