

01674

34



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCION
Y DE LA SALUD ANIMAL

OBSTRUCCION EN EL TRANSPORTE AXONAL
RETROGRADO DEL FACTOR NEUROTROFICO
DERIVADO DEL CEREBRO (FNDG) Y SU
RECEPTOR TrkB EN PERROS AFECTADOS
CON GLAUCOMA ESPONTANEO.

T E S I S
PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS
P R E S E N T A :
ASSENETH ROBLES AVILES

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TUTOR: GUSTAVO ADOLFO GARCIA SANCHEZ
COMITE TUTORAL:
FRANCISCO J. TRIGO TAVERA
VICENTE DIAZ SANCHEZ



MEXICO D.F.

2003

1



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

PAGINACIÓN DISCONTINUA

DEDICATORIA

A MI ESPOSO FRANCISCO

Por darme el apoyo e impulso que necesito, por ser mi compañero y amigo... por estar a mi lado. Te amo.

A MIS PADRES

Por estar acompañándome en cada paso de mi vida, por impulsarme a seguir adelante, por levantarme cuando me caigo y por darme tanto amor. Yo también los amo.

A MI HERMANO TONY

Por crecer en todos los sentidos a mi lado. Te quiero mucho.

A MIS AMIGOS

SYMON Y SANDY

Por tener tan en alto el concepto de la amistad y demostrarlo con su apoyo y confianza perenne. Las quiero mucho.

YOSSY

Por estar siempre en las buenas y en las malas. Te quiero mucho.

GERARDO

Porque sabemos que al día siguiente...ahí estaremos. Te quiero mucho.

2

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

AGRADECIMIENTOS

A MI TUTOR Y MAESTRO GUSTAVO A. GARCÍA

Por su enseñanza y dedicación. La oftalmología es grandiosa.

A MI COMITÉ TUTORAL

Dr. Francisco Trigo y Vicente Díaz con respeto y agradecimiento.

AL DR. GILBERTO CHÁVEZ

Por tu tan desinteresada ayuda y amistad.

AL DR. ABELARDO

Por tu ayuda para plasmar los resultados.

A LOS PERRITOS que dieron su vida. Gracias a ustedes muchos más podrán llegar a preservar su visión.

INDICE

	Página
RESUMEN	II
ABSTRACT	III
1.- INTRODUCCIÓN	
Anatomía del ojo	1
Producción y drenaje del humor acuoso	4
Definición de glaucoma	6
Lámina cribosa y axones del nervio óptico	12
Neurotrofina y receptor Trk	12
Apoptosis	19
Tratamiento para glaucoma	23
Neuroprotección	24
2.- HIPOTESIS	27
3.- OBJETIVO GENERAL	27
4.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
5.- MATERIAL Y MÉTODOS	28
- Inmunohistoquímica	30
- Procedimiento ABC	30
3.- RESULTADOS	33
4.- DISCUSIÓN	35
5.- CONCLUSIONES	39
6.- LITERATURA CITADA	40
7.- FOTOGRAFÍAS RESULTADOS	47

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESUMEN

ROBLES AVILÉS ASSENETH. OBSTRUCCIÓN EN EL TRANSPORTE AXONAL DEL FACTOR NEUROTROFICO DERIVADO DEL CEREBRO (FNDC) Y SU RECEPTOR TrkB EN PERROS AFECTADOS CON GLAUCOMA ESPONTÁNEO.

El glaucoma canino es una neuropatía en donde las Células Ganglionares de la Retina (CGR) se pierden. La degeneración progresiva de la cabeza del nervio óptico y deterioro de la visión, a pesar de que se logre bajar la presión intraocular, es una clásica evidencia de que existen otros factores no relacionados a la presión intraocular y que provoca esta neuropatía óptica glaucomatosa. Una hipótesis muy viable es de que la presión intraocular elevada induce la obstrucción del transporte axonal a nivel de la cabeza de nervio óptico inhibiendo el transporte retrógrado de neurotrofinas a las CGR. Las neurotrofinas como el Factor Neurotrófico Derivado de Cerebro (FNDC) son candidatos ideales para factores cuya interrupción de transporte puede conducir a la muerte. Para este estudio se colectaron seis ojos glaucomatoso mediante enucleación y se colectaron 4 ojos normales; todos ellos de perros raza Cocker Spaniel Americano. Se realizaron cortes de los ojos y se colocaron en laminillas tejido de retina y nervio óptico a nivel de lámina cribosa y se sometieron los tejidos a pruebas de inmunohistoquímica utilizando anticuerpos para FNDC y para su receptor TrkB. Se demostró la presencia en cantidades normales de FNDC y su receptor TrkB en aquellos ojos normales y se demostró también la disminución significativa de los mismos en los ojos glaucomatosos donde había compresión en la lámina cribosa. Se propone en este estudio una nueva alternativa a ser estudiada para la preservación de la visión: la neuroprotección.

Palabras clave: Glaucoma, Factor Neurotrófico derivado del Cerebro, receptor TrkB.

ABSTRACT

Canine glaucoma is a neuropathy where the Retinal Ganglionar Cells are lost. Besides it can be possible to lower the intraocular pressure, there are other factors that mediate the degeneration of the optic nerve and deterioration of vision other than just the high intraocular pressure promoting finally the glaucomatous optic neuropathy. A high intraocular pressure inhibits the retrograde transport of neurotrophins (Brain derived Neurotrophic Factor -BDNF) because of the obstruction of the retrograde axonal transport, then leading to death. For this study, six glaucomatous eyes were collected, and four normal eyes were collected all of them by enucleation from the American Cocker Spaniel breed. The eyes were cut and optic nerve at lamina cribosa level and retina tissue were collected and placed them in slides for immunohistochemistry where BDNF and its receptor TrkB antibodies were used. It was demonstrated the presence of the BDNF and its receptor TrkB in normal amounts on those normal eyes, and the decrease of them on those glaucomatous eyes at the lamina cribosa level. It is also proposed in this study an alternative to be studied to save glaucomatous eyes from this neuropathy: the neuroprotection.

Key words: Glaucoma, Brain derived Neurotrophic Factor, TrkB receptor.

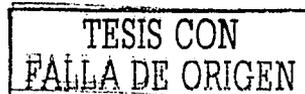
OBSTRUCCIÓN EN EL TRANSPORTE AXONAL RETRÓGRADO DEL FACTOR NEUROTROFICO DERIVADO DEL CEREBRO (FNDC) Y SU RECEPTOR TrkB EN PERROS AFECTADOS CON GLAUCOMA ESPONTÁNEO

Anatomía del ojo

El globo ocular posee tres finas túnicas que juntas forman una lámina estratificada. La túnica o capa más externa es la fibrosa, compuesta por la esclerótica y la córnea; la intermedia, llamada vascular, uvea o tracto uveal consta de coroides, cuerpo ciliar e iris (en el cuerpo ciliar el humor acuoso es producido en un rango relativamente constante por el epitelio no pigmentado); y última túnica, la más interna, es la túnica nerviosa formada por el disco óptico o nervio óptico y la retina.(22,41,47)

La túnica interna o nerviosa del globo ocular contiene las células receptoras fotosensibles y se conoce como retina. La retina es una estructura fotosensorial compleja que tiene diez láminas o capas: (1) epitelio pigmentado, (2) fotorreceptores (bastones y conos), (3) membrana limitante externa, (4) lámina nuclear externa, (5) lámina plexiforme externa, (6) lámina nuclear interna, (7) lámina plexiforme interna, (8) lámina celular ganglionar, (9) lámina de nervio fibroso (axones de las células ganglionares), (10) membrana limitante interna. (22, 41,47)

La función de la retina, como una extensión directa del cerebro, es recibir el estímulo luminoso del ambiente externo y transmitir la información al cerebro. Esta información es interpretada en una imagen, una visión. Una vez que los fotorreceptores son estimulados por la luz, transmiten un impulso nervioso que es recibido y modificado en varias formas por las células cuyo núcleo se encuentra en la lámina nuclear interna. El mensaje modificado es transferido entonces a las células ganglionares, cuyos axones forman la lámina del nervio fibroso y se extienden a través del nervio óptico al lugar de la corteza visual, donde la visión se lleva a cabo. (22, 41)



Los axones de las células ganglionares de la retina (CGR) abandonan la lámina del nervio fibroso y forman el nervio óptico; están rodeados por tres láminas meningeas del sistema nervioso central. El disco óptico es el origen del nervio óptico y en el perro es muy notorio su aspecto triangular irregular debido a una variable cantidad de mielina que lo rodea. El nervio óptico emigra de la órbita a través del forámen óptico; el nervio óptico izquierdo y derecho convergen en el quiasma óptico que se encuentra rostralmente a la glándula pituitaria. El impulso viaja a través del tracto óptico, núcleo genicular lateral y es ésta la porción que se hace responsable de la visión bilateral coordinada así como de la respuesta consensual a la luz por parte de la pupila. La mayoría de los axones en el tracto óptico terminan en el núcleo genicular lateral, forman sinapsis con neuronas cuyos axones forman la radiación óptica y terminan en la corteza occipital. (22,41)

El nervio óptico no es un verdadero nervio craneal sino un tracto de materia blanca procedente del diencéfalo compuesto principalmente de axones de las células ganglionares de la retina (CGR). Las CGR y los axones del nervio óptico proveen con la única conexión entre los fotorreceptores (FT) de la retina y los componentes centrales del sistema nervioso central (SNC). Para establecer esta unión las fibras del nervio óptico atraviesan la lámina cribosa de la esclerótica, estructura constituida por una serie de placas de tejido conectivo delimitadas por astrocitos, y organizadas en forma perpendicular a los axones nerviosos. (9,10,22,41)

El nervio óptico consta de cuatro diferentes regiones. El nervio óptico intraocular incluye la lámina de CGR, la lámina de fibras nerviosas, la cabeza del nervio óptico y la región intralaminar dentro de la esclerótica. Posterior al globo, el nervio óptico consta del nervio óptico intraorbital, nervio óptico intracanalicular (dentro del canal óptico) y el nervio óptico intracraneal que entra al quiasma óptico. (9,10,22,41)

El nervio óptico prelaminar se conoce como disco óptico, cabeza del nervio óptico o papila óptica. Su mielina se extiende anterior a la lámina cribosa para cubrir la superficie del disco óptico y se continúa dentro de la lámina de fibras nerviosas. La forma del disco óptico en el perro puede ser circular, triangular o irregular. Tiene un color que va del blanco al rosa con un punto central oscuro que es un remanente de la arteria hialoide. Las células

predominantes en la cabeza del nervio óptico son los astrocitos y ausencia total de CGR y células de Muller. (9,10,22,41)

La lámina cribosa consta de unas diez hojas lamelares con poros que se alinean para formar de 400 a 500 canales a través de los cuales pasan los axones o fibras nerviosas de las CGR. Se han reportado un promedio de 392 canales a nivel de coroides y 550 más posteriores a la lámina cribosa. (22)

Los paquetes de fibras nerviosas siguen un camino principal a través de un alineado de poros. Los axones son soportados y separados por la lámina cribosa. Dentro de los paquetes de colágena de la lámina cribosa hay vasos sanguíneos y componentes extracelulares de la matriz, que en conjunción con el transporte axonal, contribuyen en la nutrición de los axones. Los poros más largos en la lámina cribosa, están arreglados como si se tratara de un reloj de arena. A través de estas áreas pasan los axones de las CGR. (22,59)

La matriz extracelular (MEC) de la lámina cribosa junto con los astrocitos proveen un soporte mecánico y biológico a los axones de las células ganglionares de la retina; sus características de elasticidad, así como su composición bioquímica les hacen actuar como una estructura dinámica capaz de alterar su morfología de acuerdo a variantes en la presión intraocular (PIO). Los astrocitos son probablemente los responsables para la remodelación de la cabeza del nervio óptico en glaucoma. La matriz extracelular rodea y ancla las fibras nerviosas y células gliales dentro del nervio. En adición al soporte, facilita la liberación de nutrientes a los axones de las CGR. (9,22,59)

Las CGR se encuentran en la lámina de las CGR localizada entre la lámina plexiforme interna y la lámina de fibras nerviosas. Las células bipolares, interplexiformes y amácrinas de la lámina nuclear interna, provee de energía a las CGR. En el perro, la lámina de las CGR en el área central de la retina, es hasta tres veces más gruesa. Las CGR son producidas en exceso en la vida fetal y después disminuyen a sólo aquellas determinadas como células blanco en los centros del sistema nervioso. (22)

Las CGR y células de Muller son las primeras células en ser diferenciadas en la retina fetal. (5) El área *centralis* es la región con mayor densidad de CGR y donde más agudeza visual existe.(22)

La distribución espacial y organización de los axones de las CGR se extienden a través de la lámina de fibras nerviosas, nervio óptico, quiasma óptico, tracto óptico, núcleo geniculado lateral y corteza visual.(22) Los axones de las CGR se extienden desde el soma, perpendicular a la lámina de fibras nerviosas, pasando entre los axones en la lámina de fibras nerviosas, y luego, se encorvan para entrar la lámina de fibras nerviosas para proyectarse hacia el disco óptico. Los axones de las CGR junto al nervio óptico se deben proyectar a través de las fibras nerviosas que vienen de las CGR periféricas para tomar una posición en la lámina de fibras nerviosas retinales peripapilares más superficiales mientras que los axones de las CGR que descansan en la periferia retiniana se encuentran más profundos en la lámina de fibras nerviosas cerca de la cabeza del nervio óptico.(22,59)

Los axones que arriban de las CGR cerca de la fóvea y área *centralis* están situados más centralmente en el disco óptico y nervio, mientras que los axones que arriban de las CGR en la retina periférica, descansan en la periferia del disco óptico y nervio. (22,59)

Producción y drenaje del humor acuoso

Las cámaras anterior y posterior del ojo se encuentran ocupadas con un líquido transparente, relativamente libre de células conocido como humor acuoso. Este último actúa como medio de transporte para los nutrientes necesarios en las actividades metabólicas de la córnea y el cristalino; además de ayudar a mantener la forma óptica del globo ocular. El transporte intraocular de los elementos nutricionales y del metabolitos celulares requiere una circulación constante de acuoso, así como del mantenimiento de una presión intraocular constante. (8,22)

El humor acuoso se encuentra libre de células y proteínas y se produce por una secreción activa y por una ultrafiltración del epitelio que cubre el cuerpo ciliar, al igual que

por difusión. Su composición es controlada por la acción filtrante de la pared de los vasos sanguíneos y por la unión entre las células en el epitelio del cuerpo ciliar. El volumen del humor acuoso es afectado por la presión arterial así que si esta disminuye, también el volumen disminuirá. La enzima anhidrasa carbónica esta asociado también con la producción del humor acuoso, así que si se inhibe esta enzima, el líquido también lo hace. (8,22)

El humor acuoso pasa de la cámara posterior y a través de la pupila, a la cámara anterior. Pasa entre los ligamentos pectíneos y entra al borde ciliar que contiene la entramada trabecular por donde se filtra el humor acuoso y entra a los vasos del plexo venoso escleral y retorna al sistema venoso. Existen diferencias de temperatura entre el iris y la cornea creando corrientes en la cámara anterior y estas corrientes pueden producir patrones específicos de depósitos celulares en el endotelio corneal durante la inflamación. (8,22,36)

Causas en la variación de la producción de humor acuoso

Variación Diurna. La presión intraocular es ligeramente mas alta durante el día que en la noche, quizás debido a una combinación de influencias hormonales, neurogénicas y metabólicas. (22,24)

Edad. Mientras más avanza en edad el animal, la producción de humor acuoso y la presión intraocular declina. La forma en que el líquido emigra del ojo decrece conforme el animal avanza en edad, para que la presión intraocular disminuya, la producción de humor acuoso debe disminuir también a un grado aún mayor que la presión. (22,24)

Presión Sanguínea. Los desordenes que están asociados a una disminución en la presión arterial resultan en una presión intraocular baja como el hipoadrenocortisismo, deshidratación, choque hipovolémico y cardiogénico, etc. Si se aplica una ligadura en la arteria carótida, la presión intraocular baja en el mismo lado. (22)

Medicamentos. La administración tópica de epinefrina disminuye la producción de humor acuoso en los perros al inhibir a la enzima anhidrasa carbónica. Los anestésicos y los tranquilizantes provocan una caída en la presión intraocular a excepción de la

quetamina que provoca un incremento en la presión debido a los espasmos que se generan en los músculos extraoculares. (22)

Inflamación Ocular. Una cirugía ocular generalmente conducirá a una inflamación con una disminución en la producción de humor acuoso y en la presión intraocular. (22).

Definición de glaucoma

El término glaucoma se refiere a la ruta final que comparten un grupo de enfermedades caracterizadas por una neuropatía óptica progresiva en la que se observa disminución en la sensibilidad y muerte progresiva de las células ganglionares de la retina, excavación de la cabeza del nervio óptico, reducción progresiva de los campos visuales y finalmente ceguera (22,28,46). La mayoría de estas enfermedades resultan o están asociadas con un incremento en la presión intraocular (PIO), siendo éste un factor de riesgo importante en el desarrollo de daño rápido y progresivo en el nervio óptico. La mayoría de las teorías relacionadas a la patogénesis de glaucoma se pueden agrupar en dos grandes categorías: las mecánicas que sugieren un incremento de la PIO, resultando en un fenómeno crucial a nivel de la lámina cribosa; y las vasogénicas, que sugieren también una elevación de la PIO superior a la presión de la perfusión, resultando en isquemia, evento que conduce al daño axonal; sin embargo, podría existir una variabilidad individual en la composición, estructura y reactividad del tejido que sostiene a los axones del nervio óptico que pueda explicar las variaciones en la naturaleza de la excavación y atrofia del nervio óptico en respuesta a la presión intraocular y a la progresión de la neuropatía. (10,22,46) Ha sido demostrado que al momento del diagnóstico, los pacientes que tienen un daño severo en el nervio óptico tienden a empeorar más rápidamente en el desarrollo de la neuropatía glaucomatosa aún cuando se les normalice la PIO, que aquellos en que la detección del glaucoma y la normalización de la PIO se realiza mientras el daño neural es mínimo. Existen sin embargo, otros mecanismos independientes a la elevación de la PIO que participan en el desarrollo de la neuropatía óptica glaucomatosa, como son los defectos en la perfusión de la microcirculación de la cabeza del nervio óptico y de la lámina cribosa, el bloqueo en el transporte axoplásmico, los factores de crecimiento neurotrófico, el daño exitóxico

retiniano local, y las fuerzas de estrés tangencial asociadas con la atrofia peripapilar. (22,23,28,37,46)

Patogénesis de glaucoma.

En un glaucoma crónico, la mayoría de los tejidos oculares se ven afectados. La visión se ve mayormente afectada por lesiones presentes en el nervio óptico y en la retina, aunque la uvca, cristalino, cornea y esclerótica también se observan cambios. (2,15,23,25,28,30,35) El nervio óptico se ve severamente afectado y es irreversible el problema a nivel de disco óptico que pierde tejido en la porción anterior de la lamina cribosa. Las fibras que lo conforman eventualmente se atrofian y entonces ejercen una presión que forza a la lamina cribosa a dirigirse hacia fuera. Finalmente las fibras ascendentes del nervio óptico degeneran. (7,8,21,22,23,25,46,51)

Mientras más se eleva la presión intraocular, el fluido de sangre decrece causando isquemia. Las células ganglionares de la retina no son capaces de recuperarse de esta isquemia. Tanto las fibras nerviosas y la lamina de células ganglionares comienzan a degenerarse y pueden estar ausentes en varias secciones que se aprecian histológicamente. En un glaucoma crónico avanzado, las láminas externas de la retina también desaparecen, y toda la retina es reemplazada por una cicatriz glial. (1,7,8,15,23,25,46)

Cuando la presión intraocular esta muy elevada, el músculo constrictor se paraliza dando como resultado una pupila dilatada; el estroma del iris se atrofia, junto con el proceso ciliar y esto trae como consecuencia un decremento en la aportación de sangre debido a esta presión tan elevada. (7,15,23)

El cristalino se ve afectado con un glaucoma crónico manifestándose con la formación de cataratas. Mientras el cristalino se estrecha cada vez mas mientras la presión intraocular incrementa, las zonulas se rompen y entonces ocurre una luxación del cristalino. (7,15,23)

En un glaucoma agudo, hay una interferencia con la función del endotelio corneal y existe un disturbio del balance entre las fuerzas hidratantes y deshidratantes en el estroma

corneal causando edema corneal. También se puede presentar edema epitelial provocando una bulla epitelial. Frecuentemente se puede observar una vascularización superficial y profunda junto con pigmentación. (7,15,21,23,25,46)

También con la aparición de glaucoma crónico, la esclerótica se estira y el ojo se agranda provocando buphalmia. Este estiramiento es irreversible aún cuando después se pueda disminuir la presión intraocular. Si la buphalmia ha ocurrido, la visión generalmente se pierde y el grado de dolor es variable. (7,15,21,22,23)

Causas de Glaucoma

Goniodisagénesis. Este problema implica una disagénesis mesodermal que aparece con más frecuencia en el Basset Hound, Bouvier des Flandres, Cocker Spaniel, Lobero Irlandés, Husky Siberiano, Dachshund, Poodle Miniatura, Terrier Escocés, Fox Terrier pelo de Alambre y Chihuahua, y en el gato todas las razas están predispuestas pero es mucho más frecuente en el Siames. Lo que sucede es que láminas de tejido mesodermal obstruyen el acceso del humor acuoso a nivel del ángulo de la hendidura ciliar. Esta situación comienza desde el nacimiento pero no representa problema alguno sino hasta avanzado edad el animal donde los núcleos de colágeno de los ligamentos pectíneos y del tejido que cruza la hendidura ciliar se engrosan, esto hace que el espacio que existe entre ligamentos disminuya y no permita el paso del humor acuoso hacia el plexo venoso de la esclerótica. La goniodisagénesis se presenta siempre de forma bilateral. (7,8,15,23,25,46)

Obstrucción en el ángulo iridocorneal. Además de las capas de tejido obstruyendo el ángulo, células tales como melanocitos, macrófagos y células inflamatorias pueden obstruir este ángulo. Son pocos los casos de glaucoma avanzado, que no se encuentran obstruidos en el ángulo o que no se encuentran con bloqueo pupilar. Con la inflamación, se forma sinequia anterior causando que el ángulo se estreche cada vez más. (7,8,15,23)

Bloqueo pupilar. Cuando existe un bloqueo pupilar, la resistencia para que fluya el humor acuoso de la cámara posterior a la anterior se incrementa, acumulándose este en la cámara posterior y empujando la raíz del iris hacia delante provocando que el ángulo

iridocorneal se cierre. La cámara anterior se vuelve poco profunda e incrementa el contacto entre el iris y el cristalino. Aquí también con la inflamación puede haber sinequia posterior formada entre la superficie posterior del iris y el cristalino causando bloqueo pupilar. El grado de bloqueo pupilar puede ir incrementando con los episodios recurrentes de inflamación. Si el iris se encuentra completamente unido al cristalino en su circunferencia se forma un iris abombado que se desarrolla cuando el humor acuoso empuja al iris hacia delante. (7,8,15,23)

Luxación y Subluxación de Cristalino. La luxación y subluxación de cristalino pueden causar glaucoma. Generalmente el problema es hereditario. Las zónulas del cristalino se rompen usualmente después del año de edad, entonces este se luxa o subluxa. Si el cristalino se mueve hacia delante, se crea un bloqueo pupilar y el ángulo iridocorneal se cierra, junto con la formación de sinequia anterior y glaucoma. En los gatos la cámara anterior es mas profunda que en los perros así que el bloqueo pupilar y el cierre del ángulo iridocorneal son menos frecuentes. Si el cristalino se luxa posteriormente, no hay aparición de glaucoma. Si el ojo se examina y la presión intraocular esta aumentada pese a que el cristalino se encuentra luxado y situado en la parte posterior, puede deberse a que hubo una luxación anterior previa causando el bloqueo pupilar o el cierre del ángulo. También puede deberse a que el mismo movimiento del cristalino provocó el bloqueo, el cierre, o una inflamación. (7,8,15,23)

Clasificación

La clasificación básica para el glaucoma es la siguiente: (1) glaucoma primario, (2) glaucoma secundario y (3) glaucoma congénito. En el glaucoma primario, el aumento de la presión intraocular se da en ausencia de una enfermedad ocular concurrente. Este tipo de glaucoma se divide a su vez en dos tipos, ya sea ángulo abierto o ángulo estrecho. (7,8,15,23,25)

El glaucoma secundario se caracteriza por presentarse con un previo antecedente conocido o por una enfermedad ocular concurrente con la elevación de la presión intraocular, la causa es observable. Este tiende a ser un problema unilateral y no necesariamente tiene que ser debido a una causa hereditaria, sin embargo las condiciones

que puedan iniciar este tipo de glaucoma pueden estar genéticamente determinadas como en una catarata y luxación de cristalino. También se dividen de acuerdo a la causa, siendo abierto o estrecho el ángulo de la cámara anterior. (cuadro 2 y 3) (7,8,15,23,25)

En el glaucoma congénito, el incremento de la presión intraocular esta asociado con una anomalía en el segmento anterior que esta presente al nacimiento y dependiendo de la severidad de esta anomalía, el incremento en la presión intraocular puede ocurrir poco después del nacimiento del animal o años mas tarde. Este tipo de glaucoma esta generalmente asociado a una goniodisgénesis. (cuadros 2 y 3) (7,8,15,23,25)

Signos clínicos

Muchas veces el propietario del animal se presenta con la simple queja de que su mascota presenta uno o los dos ojos rojos, así que siempre se debe sospechar de glaucoma en todos los animales presentados con una conjuntivitis no específica. Una clasificación rápida y útil de glaucoma es dividirlo en glaucoma agudo y glaucoma crónico. En el glaucoma agudo, existe dolor manifestado por epifora y blefaroespasma, congestión episcleral, edema corneal especialmente si la presión intraocular es mayor de 50 mm/Hg, midriasis, pérdida de la visión y tamaño del globo ocular normal. En el glaucoma crónico, hay vascularización corneal y pigmentación, buphalmia, luxación de cristalino, se ahueca y sufre deterioro el disco óptico, presencia de catarata, hemorragia intraocular, atrofia del iris, atrofia de retina y de la cabeza del nervio óptico y encogimiento del globo. (7,23,46)

La cornea exhibe un gran numero de cambios asociados al incremento en la presión intraocular; estas anomalías están influenciadas por la rapidez, duración y extensión del incremento en la presión intraocular. La cornea se edematiza con un aumento de presión de aproximadamente 50 mm/Hg o más. Los fluidos extracelulares en el edema corneal atraviesan el estroma aunque se encuentran predominantemente debajo del epitelio corneal. El edema profundo y la opacidad que se presenta son más comunes en las etapas iniciales de glaucoma o cuando la presión intraocular incrementa dramáticamente. Histológicamente se observa que el arreglo laminar del estroma se pierde y espacios intercelulares se hacen evidentes. Con un glaucoma crónico, la cornea es infiltrada por

vasos sanguíneos y la lamina epitelial se pigmenta. Generalmente con la buftalmia se presenta también megalocornea, la cornea se ulcera y hasta puede perforarse. El edema corneal en un glaucoma agudo desaparece en unas horas una vez que la presión intraocular aumentada es controlada. (7,13,21,23,46)

La esclerótica se adelgaza y de cierto modo se atrofia. Los canales por los cuales los vasos sanguíneos y nervios penetran la esclerótica se protruyen. El área de la esclerótica en donde el nervio óptico emigra del ojo (lamina cribosa) se distorsiona y desplaza posteriormente. (7,23,46)

En la mayoría de los globos glaucomatosos se observa el ángulo iridocorneal cerrado o parcialmente cerrado. La profundidad de la cámara anterior es menor a lo normal y esto se relaciona a la estrechez que presenta el ángulo de drenaje. (15,23)

En un glaucoma avanzado, la retina se atrofia e incrementa la reflectividad tapetal, junto con esto se pierden parcial o completamente los vasos retinianos y las células ganglionares se pierden, y se atrofia el disco óptico. Los axones que se encuentran en el nervio óptico se hinchan, degeneran y desmielinizan, así pues el disco óptico pierde mielina, pierde vasculatura y se atrofia. (7,13,15,23,46)

La visión se pierde tempranamente si la presión del ojo se eleva demasiado, así que si se desea preservar la visión del animal, la disminución pronta de la presión es esencial. (7,15,23,46)

La luxación o subluxación de cristalino puede ser secundaria a un glaucoma; las zonulas se van rompiendo mientras más se agranda el globo. El cristalino se desplaza anteriormente, posteriormente o en el mismo plano del iris. (7,15)

La hipertensión ocular puede ser el único signo presente y una simple palpación sobre los globos oculares pueden dar datos significativos. (7,13,15,23,46)

Diagnóstico

El diagnóstico se basa en los signos clínicos, en la tonometría, gonioscopia, tonografía, oftalmoscopia y electroretinografía. El uso del tonómetro ayuda a estimar cuál es la presión intraocular del paciente (la presión intraocular normal en un perro es un fenómeno variable, pero en términos generales es de 15 a 25mmHg); la tonometría de aplanación resulta ser el método más aproximado para la medición de la presión intraocular (se realiza a través de la deformación del globo ocular). La gonioscopia ayuda a la visualización del ángulo iridocorneal mediante la utilización de un lente especial que neutraliza el poder de refracción de la córnea haciendo visible el ángulo. Esta técnica provee las bases para la clasificación de los glaucomas con base en la apariencia del ángulo iridocorneal, además de ayudar a determinar si el manejo del paciente será médico o quirúrgico. En un ángulo abierto el paciente responde bien a un tratamiento médico y en un ángulo estrecho o cerrado, los pacientes son candidatos para un procedimiento quirúrgico. El uso del oftalmoscopio directo y del indirecto es necesario para evaluar el fondo ocular (retina, coroides y nervio óptico). (7,15,23,45,46) La tonografía permite cuantificar el rango de eliminación de humor acuoso a través de los canales de filtración convencionales y no convencionales, al forzarse su flujo mediante un peso constante ejercido sobre la superficie ocular guante un tiempo que varía de 2 a 4 minutos. La electroretinografía se basa en la evaluación de los potenciales eléctricos generados por la retina después de la estimulación eléctrica. La electroretinografía representa una técnica adecuada de evaluación para función visual en animales. La electroretinografía donde se dirigen estímulos luminosos permite evaluar las capas externas de la retina las cuales sólo se afectan en etapas tardías de glaucoma. También se puede usar el ultrasonido y fluorofotometría aunque no son muy utilizados debido al acceso limitado que puede haber para la utilización de estas técnicas. Con el ultrasonido puede medirse la longitud axial del globo. La fluorofotometría puede ser usada para medir la formación del humor acuoso. (7,15,23,45,46)

Los diagnósticos diferenciales incluyen ulcera corneal, cuerpo extraño conjuntival, uveitis, celulitis retrobulbar, distrofia endotelial corneal, atrofia de iris, pannus, queratoconjuntivitis seca, queratoconjuntivitis, traumatismo, neoplasia intraocular,

hipertensión, displasia retiniana, desprendimiento de retina y atrofia progresiva de retina.
(23)

Lámina cribosa y axones del nervio óptico

Los axones del nervio óptico constan de una vaina externa de mielina, una pared lipídica bilaminar y un axoplasma viscoelástico que contiene moléculas de transmisión, proteínas, microtúbulos y organelos celulares. El axoplasma se mueve dentro de los axones de acuerdo a un gradiente de presión en forma ortógrada, desde el cuerpo de las CGR hacia su sinapsis en el cuerpo geniculado lateral y en el cerebro medio, y en forma retrógrada desde su sinapsis en el SNC hacia el cuerpo de las CGR. (22,59)

Neurotrofinas y Receptor Trk

La mayoría de las neuronas dependen de factores de crecimiento para su desarrollo y sobrevivencia. Estos factores son los llamados factores neurotróficos o neurotrofinas. Los factores neurotróficos constituyen una clase de moléculas proteínicas que son consideradas críticas para el desarrollo, mantenimiento y regeneración del sistema nervioso; algunas de las neurotrofinas derivan del Factor de Crecimiento Neuronal (FCN) y tienen una extensa distribución en el SNC y Periférico, y en las células no neurales, así como la presencia de receptores específicos para cada neurotrofina. (3,5,17,22,29,31,35)

El simple avance de la edad puede conducir a una lámina cribosa menos flexible. Al aumentarse la PIO se produce un incremento en la densidad de la colágena altamente reactiva tipo VI y en menor grado la I y III dentro de los poros laminares, asociado a una disminución en el número total de las fibras de colágena presentes en la lámina cribosa y a un engrosamiento de la lámina basal. También se produce una disminución significativa en la cantidad de ácido hialurónico presente en la porción retrolaminar del nervio óptico y un engrosamiento de la membrana basal en la región prelaminar de la lámina cribosa.(3,5,22) La isquemia, el estrés mecánico o las citocinas liberadas en glaucoma, activan una falta de regulación en la síntesis de elastina, que la encargada de la formación de enlaces resistentes. La orientación de la elastina normalmente se encuentra lineal adyacente a la lámina, en glaucoma se pierde y aparece curvilínea, y en casos graves, las fibras de elastina no pueden

ser ni siquiera cuantificadas. No se sabe si los cambios en la elastina contribuyen al daño neuronal en glaucoma o si los cambios son el resultado secundario de desorganización de la lámina cribosa. (3,5,22,29)

El proceso de reversión en la excavación glaucomatosa y en la reducción en el retrodesplazamiento de la lámina cribosa después de que la PIO ha sido disminuida, ha sido observada clínicamente por numerosos investigadores. (10,39)

El transporte axonal es un proceso dependiente de energía que mueve los componentes neuronales de su sitio de síntesis en el cuerpo celular a sitios de utilización a lo largo del axón y en las terminaciones nerviosas. Existen dos procesos de movimiento de flujo: el flujo ortógrado (lejos del cuerpo celular), rápido transporte axonal (400 mm/día) y el flujo retrógrado, que es lento (0.5-3 mm/día). Al aumentarse la PIO, se produce la compresión mecánica de los axones debido a la distorsión conformacional y pérdida de elasticidad dentro de la lámina cribosa de la esclerótica lo cual resulta en la rotación, compresión y colapso de los poros y canales laminares de tal forma que el flujo axoplásmico anterógrado y retrógrado del nervio óptico se reduce y finalmente se bloquea causando la muerte apoptótica de las CGR. Las CGR que pasan a través de las porciones superior e inferior de la lámina cribosa mueren más rápidamente, probablemente a causa de la baja densidad del tejido conectivo que soporta estas zonas. (34,39,44)

Las CGR se producen en exceso en la vida fetal y luego se reducen a aquellas propiamente dirigidas como blanco a los centros del Sistema Nervioso Central. Los factores tróficos que estimulan la dirección al blanco, incluyendo el FNDC para las CGR, promueven la sobrevivencia neuronal. El FNDC, en particular, ha demostrado incrementar la sobrevivencia de los fotorreceptores en la degeneración de la retina por herencia, toxicidad, y desprendimiento de retina. El FNDC también retrasa la pérdida de las CGR y de la capa interna neuronal de la retina después de la hipoxia retiniana y transección del nervio óptico.(3,17,23,29,44)

La muerte de las CGR y la pérdida de axones es observada oftalmoscópicamente e histológicamente en humanos y perros con glaucoma como un incremento en el tamaño de la

excavación fisiológica de la cabeza del nervio óptico así como por una disminución en el área del anillo neuroretiniano. En el caso de la enfermedad glaucomatosa crónica, no todos los axones mueren en forma simultánea; es por esto que en un momento dado es posible encontrar neuronas en diferentes estados de degeneración, y aunque pueden ocurrir algunas degeneraciones transínapticas, los fotorreceptores no resultan afectados. (17,23,28,40,44)

Las neurotrofinas se expresan como precursores que se procesan para producir proteínas monoméricas altamente básicas con alrededor de 13 kDa y 120 aminoácidos. En concentraciones fisiológicas, las neurotrofinas existen como homodímero-heterodímeros. (17,40,42,44)

Dentro de las neuronas del Sistema nervioso periférico (SNP), los factores de crecimiento nervioso promueven la supervivencia y diferenciación de neuronas simpáticas y subpoblaciones de neuronas neurales derivadas de la cresta, pero no tiene efecto demostrable en las neuronas sensoriales craneales, neuronas entéricas, neuronas parasimpáticas o neuronas motoras espinales. El secuestro de FCN endógeno, lleva a una completa destrucción de las CGR superiores, y pérdida de neuronas en la raíz ganglionar dorsal sobre células neuronales o no neuronales (o ambas), FCN permanecen como uno de los factores con el grado más alto de especificidad celular, con acción fuera del SNP, restringido a un número muy limitado de neuronas en el cerebro, neuronas colinérgicas largas en el cerebro anterior basal, e interneuronas colinérgicas en el cuerpo estriado. (5)

En los años treinta, el Dr. Ross Hamilton demostró que el número de neuronas sensoriales que hay en la raíz dorsal del ganglio de los embriones de anfibios, puede aumentar al transplantar la parte germinal de un miembro adicional. Por el contrario, la remoción del órgano blanco original produce disminución de las neuronas sensoriales, incluso inhibe su crecimiento. Victor Hamburger, en la Universidad de Washington, realizó los mismos trabajos pero con embriones de pollo. Sus experimentos y de otros investigadores mostraron que el crecimiento de las fibras sensoriales estaban necesariamente relacionado con la actividad del campo periférico. (5)

En 1955, Stanley Cohen, logro aislar y purificar de las glándulas salivales del ratón, la proteína responsable de estimular el crecimiento de las fibras simpáticas, y Cohen lo llamó Factor de Crecimiento Nervioso, pero su secuencia de aminoácidos fue descubierta hasta 1971. Hasta la fecha, se han identificado seis proteínas que forman la familia de las neurotrofinas, y todas ellas poseen varias características comunes como su peso molecular, la presencia de tres enlaces disulfuro entre el aminoácido cisteína, y el carácter básico de las proteínas. Las seis proteínas identificadas son Factor de Crecimiento Nervioso (FCN), Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (FNDC), Neurotrofinas 3,4,5 y 6 (NT-3, NT-4, NT-5, y Nt-6). (3,4,5,6,30,55)

El tejido periférico libera al FCN, por lo cual las neuronas orientan la dirección de su crecimiento y establecen sinapsis con sus órganos blanco. Una vez establecida la sinapsis, las neuronas, para poder sobrevivir, necesitan interactuar con el FCN a través de sus receptores específicos, localizados en la membrana plasmática. El resultado de esta interacción son los múltiples efectos que se producen por la acción de los segundos mensajeros. Por otro lado, las neuronas tienden a capturar al FCN y transportarlo por el axón en sentido contrario (transporte retrógrado) (3,4,5,6,30,34,55). El FCN le permite a la célula conocer el ambiente del medio extracelular, por lo que puede promover la polimerización de los microtúbulos y de los microfilamentos que son elementos necesarios para el crecimiento de los axones y de las dendritas. Avanzado el desarrollo, las neuronas sensoriales y simpáticas se independizan del FCN o de cualquier otra neurotrofina. Las células blanco de las neurotrofinas son aquellas células derivadas de la cresta neural, como las neuronas simpáticas largas, las cortas, las células de los paraganglios, neuronas sensoriales, neuronas coadrenérgicas y adrenérgicas, células de origen no neural, y células plasmáticas. (3,4,5,6,30,34,55)

En la vida adulta de la neurona, las neurotrofinas estimulan la actividad de algunas enzimas que intervienen en la síntesis de los transmisores, como la acetilcolina, la dopamina y los neuropeptidos. El FNDC está localizado en el citoplasma. En las interacciones ente el órgano blanco y la fibra nerviosa, no todas las neuronas responden a la misma neurotrofina. El efecto parece ser específico, y depende de la región cerebral

estudiada, de la neurotrofina y de la presencia de su receptor, por lo que algunas neuronas sensoriales responden principalmente al FNDC, mientras que el NT-3 promueve la supervivencia de las neuronas de la raíz dorsal del ganglio y de las neuronas del trigémino. (3,4,5,6,29,30,35,55)

La respuesta fisiológica de las neurotrofinas esta mediada por los receptores específicos de cada una de ellas. Hay dos tipos de receptores ubicados en la membrana plasmática. El primer tipo pertenece al receptor p75, el cual fue el primero en ser clonado. Este receptor tiene baja afinidad con el FCN, FNDC y NT-3, y se expresa principalmente en los fibroblastos. El segundo grupo de receptores pertenece a la familia de los protooncongenes Trk y son cinasa de tirosina transmembranal. La unión de Trk a FCN induce la dimerización del receptor, autofosforilación y activación de una cascada de amplificación intracelular que incluye varias rutas conocidas como MAP Cinasa (MAPK), elemento CREB etc. Las células activadas también muestran una regulación río arriba muy rápida de los genes tempranos inmediatos de c-fos y c-jun. (2,3,4,5,6,30,55)

Casi al paralelo del descubrimiento de la familia de las neurotrofinas, se han identificado parientes del Trk, encontrando afinidades muy específicas. Así, el receptor con gran afinidad obligada para la señalización FCN es TrkA, TrkB se une al FNDC y el NT-4/5 y el TrkC parece ser el receptor preferido para NT-3, sin embargo NT-3 tiene la capacidad de activar a los tres tipos de Trk. Aún no se descubre cual receptor es el que tiene afinidad por el NT-6. (3,4,5,6,29,30,32,55)

La función en general de los Trk's es, mantener unión de tipo ligando, crecimiento axónico, fosforilación del aminoácido tirosina y de la activación de la fosfolipasa C-yl y de la acinasa del 3'-fosfatidilinositol, supervivencia de las células neuronales y proliferación celular. (3,5,12,16,30,55)

La proteína TrkB es particularmente abundante en el sistema nervioso maduro. En el SNC casi todas las neuronas expresan TrkB o TrkC (o ambas) mientras que la expresión de TrkA esta restringida a neuronas colinérgicas de la parte anterior del cerebro basal o cuerpo estriado. Los receptores Trk se han detectado en toda clase de neuronas del SNP con la

excepción de neuronas parasimpáticas del ganglio ciliar. TrkA se expresa solo en en ganglio rostral dorsal y otros ganglios derivados del cerebro, mientras que TrkB y TrkC se expresan en diferente grado en todas las ganglias sensoriales(3,4,5,6,30,35,55). TrkB es un receptor complejo, con al menos siete diferentes transcritores TrkB identificados en el cerebro de rata, seis en el ratón y dos en el pez cebra. Para el hallazgo de TrkB se pueden usar anticuerpos dirigidos a dominios intracelulares o extracelulares de receptor TrkB. La disponibilidad de anticuerpos dirigidos en contra de productos de genes tempranos inmediatos y de formas fosforiladas de varias moléculas de señalización hacen posible de detectar inmunohistoquímicamente las células que se activan inmediatamente después de la exposición al factor; esto ocurre en minutos u horas, en comparación a los efectos de promoción de sobrevivencia que pueden ser detectados después de días o semanas después de iniciado el tratamiento(3,4,5,6,19,30,55)

Cada gen trk se transcribe en múltiples ARNm. TrkB existe también como proteína truncada que carece de dominio cinasa intracelular (3,4,5,6,30,55).

Las neurotrofinas existen naturalmente como homodímeros (y posiblemente como heterodímeros) y como ligandos para receptores tirosin-cinasa, activan la señal de transducción induciendo la dimerización y autofosforilación del receptor Trk apropiado. El FNDC y las neurotrofinas asociadas interactúan con células receptoras de superficie transmembranales que dimerizan después de la unión del ligando y son incorporados dentro de vesículas para el transporte retrógrado al cuerpo celular. La unión de Trk con el p75 puede incrementar la afinidad de la unión de la neurotrofina con el receptor cuando compite por una cantidad limitada de factores tróficos, participa en internalización del ligando después de la unión, participa en el transporte del FCN intracelular durante el transporte retrógrado y discriminar entre diferentes pero muy cercanos factores neurotróficos (3,4,5,6,17,30,55).

Se piensa que por repercusión después de una isquemia se eleva la expresión de FNDC y TrkB. También hay una regulación río arriba del ARNm después de la repercusión como "mecanismo autoprotector" (3,4,5,6,30,55).

Los primeros estudios en TrkA y TrkB en el ojo, revelaron su presencia solo en la lamina de células ganglionares, células de Müller y axones ópticos en la retina de la rata. Otros estudios han revelado la presencia de TrkA y TRkB en todas capas neurales de la retina excepto la de los fotorreceptores ni tampoco en el nervio óptico. (5,6,30,56)

Se ha sugerido que las neurotrofinas son moléculas blanco, actuando bajo la activación de receptores localizados en las proyecciones celulares. El ARNm del FNDC se expresa en el cerebro, en el colliculus superior, que es un área que recibe aproximadamente el 95% de las proyecciones celulares. Es posible aún, que el FNDC que actúe en las CGR deriven del Sistema Central. (5,6,30)

Se ha pensado que las células amácrinas y posiblemente algunas bipolares tengan la habilidad de sintetizar el FNDC. (6)

Apoptosis

Una característica común de todos los glaucomas y ciertamente de todas las neuropatías ópticas, es la muerte progresiva de las células ganglionares de la retina. Morfológicamente, la apoptosis se caracteriza por la condensación del citoplasma y núcleo de la célula que muere y se vuelve picnótico. A diferencia de la necrosis, la forma de muerte celular en apoptosis, no esta asociada a una respuesta inflamatoria típica. La naturaleza del mecanismo de apoptosis incluye una condensación celular, falta de lisis celular y rápida fagocitosis. (25,42,43,54)

Cuando se da la apoptosis, hay condensación de la cromatina nuclear, aparición de fragmentos intracelulares envueltos por membranas (cuerpos apoptóticos) y fragmentación internucleosomal de ADN. La fagocitosis de las células que han sufrido de apoptosis es realizada por las células que las rodean, éste proceso es activo y requiere de nuevo ARN y de síntesis protéica. (43,48,54,57)

Los genes que controlan el proceso de vida o muerte celular son el *bcl-2* el cual actúa bloqueando la activación del programa de apoptosis y el gen *bax* el cual tiene los efectos

totalmente opuestos al estimular la muerte celular. Típicamente la concentración de *bcl-2* y *bax* son iguales lo que les permite unirse uno con el otro y con las células vivas. Si la célula recibe algún estímulo para morir, se altera el patrón de expresión lo que resulta en un incremento en *bax* o una disminución en *bcl-2*, precipitando así la formación de homodímeros *bax* y la activación de apoptosis. El equilibrio entre *Bcl-2* y *bax* se puede alterar por falta de neurotrofinas. En el glaucoma si aumenta la PIO interrumpe el flujo axoplásmico retrógrado. Al parecer las neurotrofinas estimulan la expresión de genes *Bcl-2*, por lo que su ausencia estimularía la apoptosis (43,48,54,60). Actualmente se sabe que éstos genes también juegan un papel importante en la regulación del ciclo celular. Una de las moléculas clave en la regulación del ciclo celular y la apoptosis es el gen de supresión tumoral *p53*, el cual se expresa tardíamente en la fase G1 del ciclo celular actuando como un punto de monitoreo de las células para evaluar su capacidad para continuar con su división. Aquellas células que no aprueban ésta evaluación de competencia son llevadas a través de una vía alterna que termina en apoptosis. Al demostrarse la expresión incrementada de *p53* en células apoptóticas se piensa que ésta pueda actuar influenciando directamente el equilibrio entre *bcl-2* y *bax*. La privación de neurotrofinas es considerada como una causa importante de apoptosis en las células ganglionares de la retina (2,43,60). Numerosos estudios han demostrado la habilidad del FNDC y el FCN para atenuar la disfunción o la muerte celular inducida. (2,43)

En estudios realizados en ojos de monos donde la PIO está elevada, las células ganglionares de la retina exhiben muchas de las características consideradas en apoptosis. Existe además una neuropatía óptica con degeneración de la cabeza del nervio óptico, degeneración axonal del nervio óptico, pérdida preferencial de las células largas ganglionares, defectos en la lámina de fibras nerviosas y degeneración del soma de las células ganglionares. (14,27,43,48,60)

Se conocen una gran variedad de estímulos que activan la apoptosis en las células. Debido a que apoptosis aparece como un mecanismo significativo para la muerte celular ganglionar, es necesario determinar si alguno de estos estímulos están presentes en

glaucoma. De hecho, dentro de los posibles candidatos se encuentran las neurotrofinas. (43,57,60)

La privación de las neurotrofinas, puede ser la causa de apoptosis en las células ganglionares de la retina. Las células ganglionares de la retina dependen del FNDC. Este factor se libera por células en el cerebro al tiempo de desarrollo cuando los axones de las células ganglionares comienzan a hacer contacto con estas células. Las primeras células ganglionares que hacen conexión sináptica con el cerebro toman el FNDC y lo cargan de regreso a la retina mediante transporte axoplásmico retrógrado. Las CGR que hasta este momento del desarrollo no requieren de FNDC, sufren cambios moleculares que hacen que las neurotrofinas sean esenciales para la supervivencia, una dependencia que perdura por todo el resto de la vida de la célula. Estudios recientes, han demostrado que FNDC regula la muerte celular temprana durante la neurogénesis de las CGR. (11,42,43,54)

Las CGR que fallan en hacer conexión con el cerebro, adquieren también la misma dependencia por FNDC. Sin embargo, estas células no son capaces de sobrevivir por la falla en contactar la fuente de la neurotrofina. (6,43,54)

En una elevación de la presión intraocular, hay una acumulación de la proteína de *trkB* para el FNDC en, o junto a la cabeza del nervio óptico en áreas que corresponden a zonas de acumulación de vesículas visto por microscopía electrónica. El *trkB* es transportado de forma retrógrada en vesículas relacionadas a membranas en una variedad de sistemas neuronales. (6,56)

El transporte retrógrado del FNDC ocurre del área blanco central primaria para las CGR, el colliculus superior, y que es interrumpido por la elevación de la presión intraocular. (6,56)

Es sabido que las CGR producen su propio FNDC, y hay probablemente otras fuentes de abastecimiento para estas y otras neurotrofinas, sin embargo no se sabe si el FNDC endógeno tiene los mismos o diferentes efectos en las CGR que el FNDC que es

transportado de forma retrógrada de las células blanco en un complejo con su receptor trkB.
(16)

El FNDC está presente por transporte axonal directo, por transporte vascular o por difusión a través del fluido cerebro espinal. (6)

Cualquier cosa que disrumpa con el flujo de FNDC (y/o otra neurotrofina) del cerebro de la retina, hipotéticamente compromete la viabilidad de las CGR's. La inyección de FNDC de forma exógena dentro del vítreo de los ojos de la rata retrasa la apoptosis de la CGR después del corte transeccional del nervio óptico, lo cual soporta la idea de que estas células han sido privadas de esta molécula. (3,4,5,6,13,30,55)

En el glaucoma se obstruye el transporte anterógrado y retrógrado en los axones de las CGR a nivel de la cabeza del nervio óptico. Los axones de las CGR que pasan por una obstrucción en el transporte, se distienden hacia la cabeza del nervio por vesículas que se unen a membranas y que se mueven de forma bidireccional entre el cuerpo celular y la porción terminal del axón. La muerte de las CGR puede ser iniciada por el bloqueo del transporte axonal retrógrado de las neurotrofinas que normalmente llegan de las células blanco centrales. (3,4,5,6,11,30,55)

La viabilidad de las CGR depende de un balance positivo (sobrevivencia) o negativo (muerte), y fallan en su sobrevivencia si este balance es perturbado. Además, las CGR dependen no solo de los factores ya mencionados sino de la presencia de factores de excitotoxicidad (como el glutamato), que pueden sobreexcitar una célula vía activación de 1-N-metil 1-D aspartato. (3,4,5,6,11,30,55)

Los receptores TrkB moviéndose en el transporte axonal junto con las fibras del nervio óptico se bloquean a nivel de la cabeza del nervio óptico en la rata y mono con glaucoma. La elevación aguda de la PIO causa disrupción en el transporte axonal en las CGR, indicado por la acumulación de las vesículas de superficie suaves junto con los axones. El glaucoma provoca alteración en la distribución axonal de TrkB; acumulación

focal de TrkB y FNDC; niveles incrementados en neuronas GCL par TrkB y un incremento de TrkB en la glia. (3,4,5,6,30,55)

Se ha encontrado que el FNDC en combinación con el radical libre N-terbutyl-(2-sulfófenil)-nitron (s-PBN) promueve la sobrevivencia de RGC axotomizadas. El FNDC, por sí solo, promueve parcialmente la sobrevivencia de las CGR y de su receptor TrkB que se encuentra colocalizado con el óxido nítrico sintasa (ONS). El efecto adverso del FNDC pudiera ser adscrito a la activación del ONS, desde que la actividad del NADPH diaforasa (marcador para ONS) incrementa después de tratamiento crónico con FNDC. La aplicación sistémica de N-omega-nitro-L-arginin-methyl ester, un inhibidor del ONS, potencializa el efecto neuroprotector de FNDC. Así pues, la activación de ONS es una consecuencia patológica de la aplicación de FNDC, reduciendo su potencial neuroprotector. (49)

La presencia incrementada de ONS neuronal y ONS inducible, sugiere que la cabeza del nervio óptico glaucomatoso está expuesto a niveles excesivos de óxido nítrico, que, después de reaccionar con el anión superóxido, es tóxico para los axones de las CGR. (49)

Tratamiento para glaucoma

Bajar la PIO como tratamiento para glaucoma ha demostrado ser beneficioso mas no en todos los casos. El objetivo de la terapia para glaucoma es el de mantener la visión por medio de la preservación de la función del nervio óptico la cual se logra disminuyendo la PIO para prevenir un daño futuro al nervio óptico o al menos retrasar su degeneración; hasta ahora, es el único método conocido. Los tratamientos utilizados son médicos y quirúrgicos y van encaminados a inhibir la producción de humor acuoso o a reducir la resistencia al drenaje de éste. (20,23,25,45,46,50,52)

Los medicamentos más utilizados para el control de glaucoma incluyen tales como los agentes colinérgicos, que incrementan la eliminación convencional del humor acuoso, al estimular receptores muscarínicos capaces de causar la contracción del cuerpo ciliar. También son utilizados agentes parasimpaticomiméticos directos y agentes anticolinesterasa e larga duración. Ambos causan contracción del músculo ciliar. Se encuentran también

medicamentos agonistas adrenérgicos que afectan el flujo de humor acuoso a través de la red trabecular, el drenaje uveoescleral, la producción de humor acuoso y la microcirculación ocular. Los agonistas simpaticomiméticos, reducen la PIO al incrementar la eliminación del humor acuoso. (27,30) Los agonistas beta adrenérgicos, son los medicamentos más comúnmente utilizados y generalmente producen efecto aditivo con los inhibidores de la anhidrasa carbónica, al igual que con los agentes colinérgicos y simpaticomiméticos. Los diuréticos inhibidores de la anhidrasa carbónica reducen la producción de humor acuoso hasta en un 50%. Las prostaglandinas reducen la PIO al incrementar el flujo uveoescleral del humor acuoso, en lugar de inhibir su síntesis. (20,23,25,45,46,50,52)

Las técnicas quirúrgicas incluyen una iridencleisis donde se coloca permanentemente una sección del iris sobre una incisión hecha en el limbo debajo de la conjuntiva bulbar. El humor acuoso es drenado de la cámara anterior a través del espacio que se deja al realizar esta técnica. Otra técnica es la ciclodialisis donde se crea una fistula artificial entre la cámara anterior y el espacio supraintraocular, a través de una abertura en la esclerótica hacia el espacio subconjuntival facilitando el flujo del humor acuoso de la cámara anterior al espacio supracoroidal (fluido uveoesclerótico) y a través de la esclerótica a los espacios de la subconjuntiva. La iridectomía implica la remoción de la parte radial o basal del iris a través del limbo. Se puede realizar una cirugía utilizando combinaciones de estas cirugías. (20,23,25,45,46)

Una técnica muy utilizada es la ciclocrioterapia donde se aplica un intenso enfriamiento controlado a la esclerótica y hacia el cuerpo ciliar causando necrosis y reduciendo la producción de humor acuoso. Una ciclofotocoagulación transesclerótica utiliza rayos láser y destruye el cuerpo ciliar reduciendo la producción de humor acuoso. (20,23,25,45,46,50,52)

Una destrucción farmacológica del cuerpo ciliar reduce la formación de humor acuoso e implica inyectar gentamicina a la dosis citotóxica de 25 mg destruyendo el cuerpo ciliar. Este procedimiento se aplica solo para aquellos ojos glaucomatosos donde la visión ya se ha perdido, que están buftálmicos y donde los animales padecen dolor. Este procedimiento es

una alternativa a la enucleación además de ser mucho más económico, aunque si existe una degeneración corneal y ulceración con ruptura, es inevitable la enucleación. (20,23,25,45,46,50,52)

Neuroprotección

Es importante pese a todo ello, considerar nuevas formas de protección directa al nervio óptico, no sólo por medio de la reducción de PIO. La neuroprotección debe ser el nuevo avance en la ciencia para aquellos pacientes glaucomatosos. (17,38,50,58)

La neuroprotección es un paradigma terapéutico que retrasa o previene la muerte neuronal, en este caso de las CGR y sus axones. En glaucoma, la neuroprotección ofrece un método para prevenir la irreversible pérdida de las células. Teóricamente, la neuroprotección debe ser efectiva independientemente de si el glaucoma es un mecanismo de tipo primario o secundario. (17,40,38,50,58)

La neuroprotección implica, en el caso de una neuropatía glaucomatosa, que los cuerpos celulares de axones lesionados serán protegidos, permitiendo así que su rango de supervivencia incremente. Esto, obviamente, no alcanzará a recuperar neuronas cuyos axones son dañados irreversiblemente. En suma, la neuroprotección llevará a salvar axones que no están dañados directamente por causa primaria de la enfermedad, pero si no lo hacen, llevará a una degeneración secundaria como resultado de la liberación de sustancias nocivas de la lesión primaria. (38,50,58)

Junto con la terapia de neuroprotección, debe existir también la terapia médica hipotensora, previniendo así más daño primario mientras que el tratamiento de neuroprotección disminuye la degeneración de los axones dañados y rescatan las neuronas adicionales de ser afectadas por mediadores de degeneración secundaria. (38,50,58)

La muerte de las células ganglionares de la retina es apoptótica por naturaleza. La apoptosis es un proceso activo que promueve la eliminación controlada de células bajo

condiciones normales y anormales, caracterizado por alteraciones estructurales específicas en el núcleo y organelos intracelulares, incluyendo la destrucción de ADN. (38,50,58)

Los genes reguladores del ciclo celular son activados para promover la sobrevivencia a nivel de genes como el bcl2. (38,50,58)

Una neuroprotección exitosa, requiere que tanto características funcionales como estructurales actúen para que las CGR sean preservadas. Una de las vías para neuroprotección puede ser la liberación de neurotrofinas a la retina para compensar la deprivación de la neurotrofina blanco que resultó del bloqueo del transporte axoplásmico retrógrado ya sea transfiriendo los correspondientes genes o utilizando vectores virales. Otra posibilidad es la interrupción de la cascada excitotóxica. (17,40,42,38,50,58)

El efecto tan potente de las neurotrofinas *in vitro* y los efectos tan devastadores de los niveles de neurotrofinas disrumpidas *in vivo* tanto para el golpe demoledor de genes o por el secuestro de anticuerpos ha incitado mucho interés en que la posibilidad de que dosis farmacológicas de neurotrofinas puede atenuar el daño nervioso a neuronas sensoriales resultando de un trauma, insulto metabólico o enfermedad neurodegenerativa. (38,50,51,58)

Cualquier proceso, sin importar el comienzo de la degeneración a lo largo del axón, llevará, eventualmente a la muerte de la CGR. Si se protegen sólo los cuerpos celulares de los axones degenerados, no se logrará recuperar la función, pero sin embargo, mientras el cuerpo celular no muera, se puede re-crecer a los axones y reconectarlos. Una vez que los cuerpos celulares se están muriendo, es irreversible. Si se daña el cuerpo celular directamente, el tiempo en lo que muere la célula es relativamente corto, aunque aún así existe una demora. En contraste, si por ejemplo, se lastima el axón, en el disco, hay una ventana más prolongada de oportunidades para una terapia de neuroprotección. (38,50,58)

HIPOTESIS

En el perro afectado con glaucoma primario agudo existe una elevación en la presión intraocular capaz de causar un bloqueo en el transporte axonal retrógrado del nervio óptico a nivel de la lámina cribosa de la esclera, lo cual produce una disminución en el aporte de FNDC que participa en el desarrollo de aparición de apoptosis y muerte de las CGR.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia de FNDC y su receptor TrkB en los nervios ópticos y retinas de perros normales y de perros con glaucoma primario agudo.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

-Establecer un método de perfusión y fijación de tejido que permita evaluar la presencia de la neurotrofina y sus receptores por métodos inmunohistoquímicos.

-Determinar el tiempo de incubación así como las concentraciones de anticuerpos primarios y secundarios para realizar las técnicas de inmunohistoquímica en retinas y nervios ópticos de perros normales y glaucomatosos.

-Establecer los controles positivos y negativos para la evaluación de los estudios de inmunohistoquímica.

-Establecer la presencia de FNDC y Trk B en retina y nervio óptico de perros normales y glaucomatosos mediante sistemas computarizados.

MATERIAL Y MÉTODOS

Raza estudiada:

En el Cocker Spaniel Americano, los perros afectados muestran signología de enfermedad temprana pudiendo comenzar desde los dos años de edad. Los hallazgos clínicos incluyen ángulo iridocorneal estrecho, presión intraocular elevada, nervio óptico socavado y retina degenerada. Si no se da tratamiento, la enfermedad progresa y resulta en un ángulo iridocorneal cerrado secundario, subluxación o luxación del cristalino, buftalmia y atrofia del nervio óptico. Este estudio incluye ojos normales y afectados obtenidos de perros raza Cocker Spaniel Americanos.

Material y Metodología:

Perros normales (utilizados como grupo control) y glaucomatosos agudos se les aplicó la eutanasia y sus ojos se perfundieron con una solución de paraformaldehído al 4% con el fin de fijar los globos oculares y nervios ópticos. El tejido se procesó para microscopía de luz e inmunohistoquímica de acuerdo a procedimientos estandarizados. Se realizaron determinaciones inmunohistoquímicas para FNDC y TrkB tanto en tejido normal como con el proveniente de pacientes glaucomatosos. El tejido se evaluó mediante un sistema de videomicroscopio digitalizado Sony/Nikon, las células ganglionares se identificaron en cada área (30 células ganglionares normales y 30 células ganglionares glaucomatosas) y utilizando un sistema Sigma Scan Pro 4.0 se estableció una escala de grises para finalmente establecer valores cuantitativos de retención de la tinción.

La detección del FNDC y su receptor TrkB fue mediante la técnica de inmunoperoxidasa por el método del Complejo Streptavidina-Biotina. Se utilizaron los ojos de perros sanos como testigos (+ y -) y con los ojos glaucomatosos (+ y -), utilizando las soluciones de xileno, acetona, alcohol absoluto, alcohol al 96% y al 70% y agua destilada, solución amortiguadora, peróxido de hidrógeno, metanol, hematoxilina de Mayers, resina sintética, suero normal de carnero (SNCa) y suero normal de conejo (SNCc), anticuerpos primarios para FNDC a una dilución de 1:300 y para TrkB a una dilución de 1:50; anticuerpos secundarios (IgG antiratón para FNDC y para TrkB), complejo Avidina-Biotina y revelador (DAB).

Se colectaron pues, seis ojos glaucomatosos mediante enucleación debido a glaucoma:

- 2 en etapas tempranas
- 2 en etapas moderadas
- 2 en etapas avanzadas
- y se colectaron además 4 ojos normales.

La edad de los perros normales variaba entre los tres y ocho años siendo dos hembras y dos machos y la de los perros glaucomatosos variaba entre los cuatro y siete años de edad y eran dos hembras y cuatro machos. El peso promedio era de 9.400 kg, con un rango de entre los 6.200 kg y los 12.600 kg.

Los ojos de los perros fueron previamente examinados mediante el uso de tonometría (con el Tonpen), gonioscopia, lámpara de hendidura, y se examinó el fondo del ojo mediante el uso del oftalmoscopio indirecto. Los perros con ojos normales, mostraron un ángulo iridocorneal normal, presión intraocular con un rango de entre 14mmHg y 20mmHg, globo ocular normal, segmento anterior normal, y cámara posterior (fondo de ojo) normal. En aquellos ojos glaucomatosos se observaba un ángulo iridocorneal que iba de parcialmente cerrado a completamente cerrado. La presión intraocular variaba de entre 30 mmHg y 60mmHg, los ojos lucían de normales a bupfálmicos, vasos episclerales congestionados en todos los ojos, segmento anterior donde lucía el iris de normal a ligeramente atrofiado, pupila de parcial a completamente dilatada, cristalinos normales; cámara posterior donde lucía la retina de parcial a completamente atrofiada y el nervio óptico de parcial a completamente degenerado; la visión iba de parcial a completamente perdida.

A estos perros se les realizó una inducción con anestesia fija con tiopental sódico a una dosis de 10 mg/kg y después se mantuvieron con anestesia de pentobarbital sódico a una dosis de 25 mg/kg y la inducción de oxígeno previo sondeo endotraqueal a una dosis de 40 ml/kg bajo un sistema semicerrado. Posteriormente, se perfundieron las cabezas de los perros a través de una cánula colocada en cada una de las carótidas y se les pasó solución salina fisiológica (500ml) conteniendo 1,000 U por cada 100 ml de heparina. Después se perfundieron con 800 ml de paraformaldehído frío al 4 % en 0.1 molar de fosfato buffer salino y con un PH exacto de 7.4. A continuación, los ojos fueron enucleados y se les hizo una incisión a nivel de la córnea con la finalidad de la buena penetración del

paraformaldehído. Los ojos se mantuvieron sumergidos en una solución de cacodilato trihidratado por 12 horas, y después de transcurrido este tiempo, se les realizaron lavados con solución PBS cada 15 minutos, en cuatro repeticiones.

Los ojos ya listos, fueron embebidos en parafina y orientados en bloques para secciones sagitales y transversales de 6 μ m y colocados en laminillas para su posterior manejo de inmunohistoquímica, donde se evaluó la retención de colorante en escala de grises.

Inmunohistoquímica:

Metodología:

Previo a la fijación de los tejidos, las laminillas fueron tratadas con xileno para tener una buena fijación.

Técnica:

- 1.- Se lavaron las laminillas con agua corriente, y se dejan secar.
- 2.- Se colocaron las laminillas en xileno por 3 minutos.
- 3.- Se lavaron con agua destilada, por tres ocasiones.
- 4.- Se secaron en la estufa a 56°C por 18 horas aproximadamente, según el número de laminillas a tratar.
- 5.- Se colocaron los tejidos sobre las laminillas para realizar la inmunohistoquímica.

Procedimiento del método ABC

1.- Se colocaron las laminillas marcadas de cada uno de los tejidos como positivos, y control en gradillas o canastillas y se sumergieron en Xilol (marcado como xilol 1) por 10 minutos y se colocaron después en Xilol 2 por otros 10 minutos o hasta que ya no se encuentre parafina intermezclada con el tejido.

2.- Terminado este proceso, se sumergieron en alcohol al 96%, se enjuagan y pasan al alcohol al 80%; finalmente se colocaron en agua destilada por 10 minutos para que queden perfectamente bien lavadas.

3.- En vasos de Coplin, se agregaron buffer de citratos y ahí se colocaron las laminillas y se tapaban los vasos. Los vasos de Coplin fueron entonces colocados en vasos con agua corriente (a manera de crear un baño maría) y se colocaron en el microondas por 5

minutos, se dejaron enfriar y se dieron otros 5 minutos según lo requiriera para que quedaran a temperatura ambiente; había que verificar que no se evaporaran los líquidos.

4.- Posteriormente se desechaba el buffer de los Coplin y se aplicaba buffer de fosfatos y se dejaban las laminillas por otros 10 minutos, y se repitieron en dos ocasiones más la operación de desechar el buffer de fosfatos y reemplazarlo por lo mismo 10 minutos, para limpiar bien los tejidos del buffer de citratos.

5.- Terminada esta repetición, se desechaba el buffer de fosfatos y entonces se agregaba a las laminillas peróxido de hidrógeno diluido con agua por 15 minutos haciendo dos cambios de esta solución. Se enjuagaba el exceso de peróxido de hidrógeno con buffer de fosfatos de 2 a 3 veces.

6.- Se preparaba una cama húmeda, se colocaban las laminillas en ella, y se delimitaba el tejido con crayola o con lápiz diamante. Se colocaba en los tejidos positivo y control el anticuerpo primario. Se tapaba la cama húmeda y se colocaba en cuarto frío o en refrigerador durante toda la noche.

Segundo día

1.- Se sacaba la cama húmeda y se verificaba que las laminillas contuvieran el anticuerpo primario; se rotulaban dos vasos de Coplin como positivo y negativo con buffer de fosfatos y se dejaban por 10 minutos para realizar un primer lavado y se hacía un recambio con el mismo buffer por otros 10 minutos para realizar un segundo lavado.

2.- Las laminillas entonces se sacaban, se escurrían, se secaban sin tocar tejido y se colocaban nuevamente en la cámara húmeda y se agregaba el segundo anticuerpo (antiratón) y se tapaba. Se colocaba en el horno a una temperatura de 37°C por 60 minutos.

3.- Transcurrido el tiempo, se sacaban las laminillas y se escurría el exceso del segundo anticuerpo y se lavaban con buffer de fosfatos por 30 minutos, cada 10 minutos haciendo un cambio del buffer.

4.- Posteriormente se dejaban escurrir las laminillas y se secaban, se colocaban en la cámara húmeda y se les colocaba el complejo (en este caso, streptoavidina) para señalar al segundo anticuerpo que ya se encontraba unido al primero.

5.- Se colocaban nuevamente las laminillas en el horno a una temperatura de 37°C por 60 minutos, y transcurrido este tiempo, se realizaban los tres lavados con el buffer de fosfatos con intervalos de 10 minutos cada uno.

6.-Se escurrían las laminillas, se les colocaba una gota de revelador y se esperaba a que tomaran un color café tenue. Se secaban entonces las laminillas y se contrateñía con hematoxilina (que tiñe al núcleo) o con eosina (que tiñe al citosol) al sumergir las laminillas en vitrinas conteniendo estas sustancias por 2 ó 3 minutos.

7.- Se sacaban y se colocaban al chorro de agua y se metían en los alcoholes pero comenzando por los alcoholes y terminando por los xiloles. Se secaban las laminillas y se les colocaba una gota de resina y se ponía el cubreobjetos y se dejaban reposar por 24 horas y transcurrido ese tiempo se podían observar al microscopio.

RESULTADOS

Los 10 ojos (tanto los glaucomatosos como los normales) resultaron positivos a la inmunohistoquímica por el método ABC, tiñendo en el citoplasma de una o más CGR indicando FNDC y TrkB positivos. La disminución de estos mismos a nivel de lámina cribosa pero con los marcajes positivos fueron vistos también a través de la microscopía electrónica.

La clasificación que se dio para los tejidos observados fue:

-Negativo

-Positivo y dentro de éste, Focal o Difuso, y Débil o Intenso

-Se observó un marcaje intenso en el tejido periférico a la CGR (en la Lámina de Fibras Nerviosas y en menor intensidad en la Lámina plexiforme interna) y en el citoplasma de las CGR mas no se observó marcaje en el núcleo. El tejido con marcaje aledaño a las CGR incluye oligodendrocitos, astrocitos, microglia.

-La localización del bloqueo no se observó tan evidente junto a la cabeza del nervio óptico mas lo fue dentro de la cabeza del nervio óptico a nivel de lámina cribosa.

-En los ojos normales, se encontró marcaje para TrkB en la Lámina de Fibras Neuronales, en las CGR y en la Lámina Plexiforme Interna, con un marcaje mucho más intenso a nivel de la Lámina de Fibras Neuronales.

-En los ojos normales, TrkB estaba distribuido uniformemente en los septos neurales de la cabeza del nervio óptico y nervio óptico.

-En ojos glaucomatosos, TrkB tuvo un marcaje mucho más intenso en la cabeza del nervio óptico más que en el nervio óptico o retina.

-Los tejidos de perros con ojos normales, con marcadores para FNDC, tiñeron todos como positivos, con positividad focal y débil y positividad difusa y débil a nivel de células ganglionares de retina y con positividad difusa e intensa a nivel de lámina cribosa sobre parénquima de nervio óptico (porción retrolaminar).

-Los tejidos de perros con ojos normales, con marcadores para TrkB, tiñeron todos como positivos, con positividad de intensidad moderada focal a nivel de células ganglionares de la retina y con positividad débil y difusa en la porción preliminar.

-Los tejidos de perros con ojos glaucomatosos, con marcadores para FNDC, tiñeron todos como positivos, con positividad difusa e intensa y focal e intensa; algunas de las laminillas mostraron disminución parcial en el número de células ganglionares.

-Los tejidos de perros con ojos glaucomatosos, con marcadores para TrkB, tiñeron todos como positivos, con positividad intensa y focal a nivel de las células ganglionares en la retina y con disminución parcial en algunas laminillas y fuerte en otras el número de las células ganglionares de la retina. También se observó positividad difusa e intensa a nivel de porción preliminar del nervio óptico.

Especificaciones:

-La neurotrofina del Factor Neurotrófico Dervado del Cerebro y TrkB se expresaron en las células de la lámina cribosa, en los astrocitos de la cabeza del nervio óptico, y en el tejido de la cabeza del nervio óptico, en dos de los ojos glaucomatosos.

-Se observó marcaje incrementado para TrkB en la lámina fibrosa nerviosa, células ganglionares de la retina y células amácrinas en dos ojos glaucomatosos.

-Los axones cerca de las células ganglionares de la retina tiñeron para TrkB pero se interrumpían a nivel de lámina cribosa.

-El Factor Neurotrófico Dervado del Cerebro tiñó con menor intensidad que TrkB pero estaba incrementado más allá de los niveles normales en las Células Ganglionares de la Retina y cabeza del nervio óptico en dos ojos con glaucoma.

-Acumulación de TrkB en y atrás de la cabeza del nervio óptico en áreas que corresponden a zonas de vesículas acumuladas.

DISCUSION

Este estudio confirma la presencia del Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro y su receptor TrkB en las Células Ganglionares de la retina (CGR) tanto en ojos de perros normales como de glaucomatosos. Para nuestro conocimiento, esta es la primera evidencia de la expresión de ambos en los ojos de los perros. Se obtuvieron resultados extras hallando que se encuentra muy involucrada la glia en el proceso glaucomatoso.(40)

El estudio sugiere que el receptor TrkB moviéndose en el transporte axonal dentro de las fibras del nervio óptico se bloquean a nivel de la cabeza del nervio óptico en los perros con glaucoma. La elevación de la Presión Intraocular aguda causa disrupción en el transporte axonal en las CGR, indicado por la acumulación de vesículas de superficie suave dentro de los axones y de mitocondria, siendo esto una observación similar después de una presión intraocular elevada crónica. (40)

La alteración en el patrón normal de TrkB es por una alteración de la distribución normal en la distribución axonal del TrkB, acumulación focal de TrkB y FNDC, incremento del receptor en las CGR e incremento del receptor en la glia. (40)

El relativo incremento en el marcaje axonal detrás de la cabeza del nervio óptico comparado al marcaje dentro del ojo indica la obstrucción del transporte axonal retrógrado del receptor TrkB. El incremento es evidente en estas etapas y en este sitio del FNDC.

La acción trófica de los receptores de tirosin-cinasa median mecanismos en las CGR y son un componente importante en la ruta que va de la lesión del axón a la muerte. Existe un balance entre la neurotrofina y su receptor que mantiene a las células ganglionares de la retina (CGR) vivas y promueven su crecimiento y que si hay un daño directo a ellas, la neurotrofina Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (FNDC) y su receptor TrkB en un primer intento de salvar a las CGR aumentan en cantidad; tras un fallo en el transporte retrógrado de esta neurotrofina y su receptor, disminuyen en cantidad, conduciendo a las CGR a la muerte por apoptosis.

En los ojos glaucomatosos de los perros, la pérdida de células ganglionares de la retina, la reducción parcial o total en su número u otros factores, limitarán la incorporación de proteínas y el subsecuente transporte axoplásmico ortógrado. (52)

El receptor de la neurotrofina FNDC, TrkB está presente en el axon del nervio óptico y su distribución cambia con el glaucoma agudo y crónico sugiriendo la interrupción en el transporte a nivel de la cabeza del nervio óptico.(44) En este estudio se encontró una reducción en el transporte axonal del FNDC hacia las CGR a una presión intraocular de 25mmHg y más. (44) Cuando el daño aún no es muy fuerte, la coroides y la lámina cribosa de la esclerótica exhibe axones dilatados, con una acumulación ocasional de mitocondria, vesículas y cuerpos densos. En la porción retrolaminar la mitocondria esta hinchada y agrupada con otras. Se sugiere entonces que los cambios son muy dramáticos entre un glaucoma temprano y uno muy avanzado donde los cambios patológicos son mucho más extensos, con las células gliales (astrocitos, oligodendrocitos y microglia) están hipertrofiadas o hiperplásicas y edematosas. Los axones exhiben una gran variedad en su diámetro, grosor y ausencia o presencia de mielina. Todos estos cambios en la glia pueden ser entonces un cambio patológico importante que conduce a una muerte de la retina, sugiriendo también la necesidad de observar de cerca también los cambios a este nivel. (44)

Con una elevación en la PIO, el citoplasma neuronal tenía un marcaje mucho más intenso que en los axones por anticuerpos de TrkB. Esto puede ser resultado de un decremento en la proteólisis del receptor, por un fallo en el receptor sintetizado para abandonar el cuerpo celular, un incremento en la producción del receptor o un incremento en la llegada del receptor que viene de la terminal del axon. El incremento en la síntesis del receptor no puede ser medido por inmunohistoquímica. Tal respuesta puede deberse a una "respuesta de retroalimentación" a niveles bajos del TrkB activado causado por el bloqueo del transporte retrógrado (40). Las neurotrofinas secretadas por las células blanco son tomadas por los receptores a nivel de la terminal del axon y cargados de regreso al cuerpo celular neuronal por transporte retrógrado. Sin embargo, esta evidencia solamente cuenta para un aspecto de la acción de la neurotrofina. La expresión de la neurotrofina por células que no vienen de las células blanco y la localización de los receptores de las neurotrofinas a

los cuerpos celulares neuronales y dendríticos y a lo largo del axon, muestran que células diferentes a las neuronales pueden ser capaces de responder a las neurotrofinas. (33)

El ARNm del TrkB y del FNDC se detectan tanto en CGR y en la lámina nuclear interna. La demostración de que hay TrkB en la CGR madura, sostiene la sugerencia de que el FNDC producido en las células blanco del cerebro y por las mismas CGR tienen un efecto de sostén aún en la retina adulta. La expresión de ARNm de trkB en la lámina nuclear interna se correlaciona con un efecto protector del FNDC exógeno en contra de la isquemia que daña a las células localizadas en la lámina nuclear interna, y también con la presencia del ARNm del FNDC en la Lámina Celular Ganglionar y en la Lámina Nuclear Interna (mecanismo autócrino de autoproducción).

Como los fotorreceptores y células en la lámina nuclear interna son también sensitivos al FNDC, es razonable asumir que aún las mismas células retinales tienen la habilidad de sintetizar y secretar el FNDC. (44)

Aunque las neurotrofinas no se producen normalmente en nervios periféricos maduros, las lesiones pueden conducir a la síntesis de neurotrofinas como el FNDC, en y distal al sitio de la lesión. Se ha sugerido que las neurotrofinas sintetizadas en lesiones de nervios periféricos ayudan a mantener la sobrevivencia de las neuronas lesionadas y aumentan también la regeneración de sus axones. (33)

Ya que trkB largo y truncado pueden dar marcaje en la lámina ganglionar celular, y en nervio óptico, puede sugerir que las CGR se unen a las neurotrofinas por fuentes a lo largo de sus axones. Estas fuentes pueden ser células de la lámina cribosa y/o astrocitos de la cabeza del nervio óptico. Así, bajo circunstancias normales, las CGR pueden recibir la mayor parte de su soporte de neurotrofina de fuentes retrógradas de neurotrofinas. Sin embargo, el transporte retrógrado es bloqueado a nivel de la lámina cribosa; y para permanecer viable, las CGR requieren de neurotrofina adicional de fuentes parácrinas como las de las células de la lámina cribosa o los astrocitos de la cabeza del nervio óptico. Si decrece la síntesis de neurotrofina o de trk ya sea por las células de la lámina cribosa o por

por los astrositos de la cabeza del nervio óptico, se reducirá finalmente la cantidad de neurotrofina disponible para las CGR. Las células ganglionares morirán entonces lentamente ya que las neurotrofinas disponibles de la fuente retrógrada y parácrina decrecerán(18); las células ganglionares entonces, se unirán y activarán a receptores trk cercanos a células de la lámina cribosa y astrositos de la cabeza del nervio óptico, así la colocación de neurotrofinas y proteínas de receptores trk dentro de la misma población celular apoya la posibilidad de una interacción parácrina y/o autócrina de las neurotrofinas.(33)

Esto indica que la viabilidad de las CGR durante el desarrollo esta determinado por niveles del FNDC, y por el hecho de que las mismas CGR son capaces de producir el FNDC. La sobrevivencia de las CGR es dependiente tanto del FNDC derivado de las células blanco como de aquellas neurotrofinas producidas localmente.(44)

Lo que aún se desconoce es si el FNDC endógeno tiene efectos iguales o diferentes en las CGR que el FNDC que es transportado de forma retrógrada de las células blanco unido a su receptor.(44)

Hay que considerar nuevas formas de protección directa al nervio óptico, no sólo por medio de la reducción de PIO. La neuroprotección debe ser el nuevo avance en la ciencia para aquellos pacientes glaucomatosos. (17,38,50,58) También se debe considerar el hecho de que las neurotrofinas secretadas por células de la lámina cribosa y por los astrositos pudieran servir como una alternativa de fuente de neurotrofinas para las células ganglionares de la retina. Aunque los receptores trk no han sido examinados en los axones de las células ganglionares de la retina sin mielina dentro de la lámina cribosa, se han localizado en los cuerpos celulares neuronales, dendritas y axones dentro del Sistema Nervioso Central. Esta propuesta se sostiene con el hecho de que en este estudio se ha demostrado el marcaje de trkB en la lámina de las células ganglionares de la retina, en los axones de las células y en el nervio óptico, sugiriendo que las células ganglionares de la retina se unen a neurotrofinas de fuentes a lo largo de los axones. (33)

CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio indican que hay dos poblaciones celulares específicas dentro de la lámina cribosa que expresan neurotrofinas y receptores TrkB que a su vez secretan neurotrofinas. Hay evidencia de que el FNDC y trkB son expresados por células no neuronales. Esto soporta la idea de que la señalización de las neurotrofinas puede regular más que desarrollo neuronal, supervivencia y diferenciación. (33)

LITERATURA CITADA

1. Anderson DR. Glaucoma: The damage caused by pressure. XLVI Edward Jackson Memorial Lecture. *Am. J. Ophthalmol.* 108:485-495, 1989.
2. Arrowsmith CH. Structure and function in the p53 family. *Cell Death Differ.* 6: 1169-1173, 1999.
3. Asai Camacho M. Las neurotrofinas. *Salud mental.* 20 (4) 2:55-59, 1997.
4. Barbacid M. The Trk Family of Neurotrophin Receptors. *J. Neurobiol.* 25: 1386-1403, 1994
5. Barker PA, Murphy RA. The nerve growth factor receptor: a multicomponent system that mediates the actions of the neurotrophin family of proteins. *Mol. Cel. Biochem.* 110:1-15, 1992
6. Bibel M, Hoppe E, Barde Y-A. Biochemical and functional interactions between the neurotrophin receptor TrK and p75 NTR. *EMBO J.* 18:616-622, 1999
7. Brooks DE. Glaucoma in the dog and cat. *Vet. Clin. North Ame. (Small Anim. Pract.)*, 20: 775-797, 1990.
8. Brooks DE, Dzizyc JD. The canine glaucomas: Pathogenesis, diagnosis and treatment. *Comp. Cont. Educ.* 5:292-301, 1983
9. Brooks DE, Kamaromy AM, Kallberg ME. Comparative retinal ganglion cell and optic nerve morphology. *Vet. Ophthalmol.* 2:3-11, 1999.
10. Brooks DE, Kamaromy AM, Kallber ME. Comparative optic nerve physiology: implications for glaucoma, neuroprotection and neurodegeneration. *Vet. Ophthalmol.* 2:13-25, 1999

11. Brubaker RF. Delayed functional loss in glaucoma. LII Edward Jackson Memorial Lecture. *Am. J. Ophthalmol.* Vol. 121:473-483, 1996.
12. Caminos E, Becker E, Martin-Zanca D, Vecino E. Neurotrophins and their receptors in the tench retina during optic nerve regeneration. *J. Comp. Neurol.* 404:321-331, 1999.
13. Carlton WW, Mc Gavin DM. Thomsons's Special Veterinary Pathology. 2nd ed. USA: Mosby, 253-571, 1995.
14. Chew JS, Ritch R. Second annual optic nerve rescue and restoration think tank meeting. *J. Glauc.* 5:147-149, 1996
15. Coleman AL. Glaucoma. *Lancet.* 354:1803-1810, 1999.
16. Condorelli DF, Salin T, Dell Albani P. Neurotrophins and their Trk receptors incultured cells of the glial lineage and in white matter of the central nervous system . *J. Mol. Neuroscis.* 6:237-248, 1996
17. Croll S, Nancy Y. Expression of BDNF and TrkB as a function of age and cognitive performance. *Brain Res.* 812:200-208, 1998
18. Davies A. Paracrine and Autocrine Actions of Neurotrophic Factors. *Neurochem. Res.* 21: 749-753, 1996.
19. Di Polo A, Cheng L, Bray GM, Aguayo AJ. Colocalization of TrkB and Brain-Derived Neurotrophic Factor Proteins in Green-Red-Sensitive Cone Outer Segments. *IOVS.* 41:4014-4021, 2000.
20. Ekesten B. Surgical treatment of canine glaucomas. *Eur. J. Comp. Anim. Pract.* 5:17-19, 1995



21. Fechtner RD, Weinreb MD. Mechanisms of optic nerve damage in primary open angle glaucoma. *Surv. of Ophthalmol.* 39: 23-42, 1994.
22. Gelatt KN, Brooks DE, Anatomy. En: Veterinary Ophthalmology. Editado por Gelatt KN. 33-111. 3ª ed. Ed. Lipincot Williams and Wilkins. Pensilvania 1999
23. Gelatt KN, Brooks DE, The Canine Glaucoma. En: Veterinary Ophthalmology. Editado por Gelatt KN. 701-754. 3ª ed. Ed. Lipincot Williams and Wilkins. Pensilvania 1999
24. Graham SL, Drance SM, Wijsman K et al. Nocturnal Hypotension in glaucoma patients dippers or non-dippers. *Intl Symp on Glaucoma.* Athens; 24-25, 1993.
25. Gwin RM. Current concepts in small animal glaucoma, recognition and treatment. *Vet. Clin. of north Am. (Small An. Pract.)* 10:357-376
26. Haines DM, Chelack BJ. Technical considerations for developing enzyme immunohistochemical staining procedures on formalin-fixed paraffin-embedded tissues for diagnostic pathology. *J. Vet. Diagn. Invest.* 3: 101-112 (1991)
27. Hayreh SS. Pathogenesis of cuping of the optic disc. *Br. J. Ophthalmol.* 58: 863-876, 1974
28. Hernandez R, Pena JDO. The optic nerve head in glaucomatous optic neuropathy. *Arch. Ophthalmol.* 115:389-395
29. Ikeda K, Tanihara H, Honda Y, Tatsuno T, et al. BDNF Attenuates Retinal Cell Death Caused by Chemically Induced Hypoxia in Rats. *IOVS* 40:2130-2140, 1999.

30. 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.* 24:1207-1214, 1993
31. Johnson D, Lanahan A, Buck R, Sehgal A, et al. Expression and Structure of the Human NGF Receptor. *Cell.* 47:545-554, 1986
32. Klein R, Jing S, Nanduri V. The trk Proto-Oncogene Encodes a Receptor for Nerve Growth Factor. *Cell.* 65: 189-197, 1991
33. Lambert W, Agarwal R, Howe W, et al. Neurotrophin and Neurotrophin Receptor Expression by Cells of the Human Lamina Cribosa. *IOVS.* 42 :2315-2322, 2001.G
34. Lentz SI, Knudson CM, Korsmeyer SJ, Snider WD. Neurotrophins support the development of diverse sensory axon morphologies; *J. Neurosci.* 19:1038-1048, 1999
35. Lindsay RM. Role of neurotrophins and TrK receptor in the development and maintenance of sensory neurons: an overview. *Phil. Trans. R. Soc. Lond B.* 351:365-373, 1996
36. Martin CL. Gonioscopy and anatomical correlations of the drainage angle of the dog. *J. Small anim. Pract.* 10: 171-184, 1996
37. Michelson G, Langhans M.J., Groh M.J.M. Perfusion of the Juxtapapillary retina and the neuroretinal rim area in primary open angle glaucoma. *J. Glauc.* 5:91-98,1996
38. Naskar R, Dreyer EB. New horizons in neuroprotection. *Survey Ophthalmol.* 45:250.272
39. Nickells RW. Retinal ganglion cell death in glaucoma: The how, the why and the maybe. *J. Glauc.* 5: 345-356, 1996.

40. Pease ME, McKinnon S, Quigley HA, Kerrigan-Baumrind LA, Zack DJ. Obstructed axonal transport of BDNF and its receptor TrkB in experimental glaucoma. *Invest. Ophthalmol. & Vis. Sc.* 41 3: 764-774, 2000
41. Peiffer R, Pertersen JS. *Small Animal Ophthalmology*. 2nd ed. 325-343. Saunders Company. Filadelfia, 1997
42. Perez MT, Caminos E. Expression of brain-derived neurotrophic factor and of its functional receptor in neonatal and adult rat retina. *Neurosc. Letters* 183:96-99, 1995.
43. Quigley HA, Nickells R, Kerrigan L, Pease ME, Zack D. Retinal ganglion cell death in experimental glaucoma and after axotomy occurs by apoptosis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sc.* 36:774-785, 1995
44. Quigley HA, McKinnon SJ, Zack DJ, Pease ME, et al. Retrograde Axonal Transport of BDNF in Retinal Ganglion Cells Is Blocked by Acute IOP Elevation in Rats. *IOVS*. 41: 3460-3466, 2000.
45. Rathbone J. Recongizing and managing acute and chronic cases of glaucoma. *Vet. Med.* 3: 265-275, 1995.
46. Renwick P. Diagnosis and management of Glaucoma. *In. Prac.* 17:10-20, 1993
47. Samuelson D. . En: *Veterinary Ophthalmology*. Editado por Gelatt KN. 31-145. 3rd ed. Ed. Lipincot Williams and Wilkins. Pensilvania ,1999.
48. Selles I, Villegas M, Salvador M, Vidal M. Retinal Ganglion Cell Death After Different Transient Periods of Pressure-Induced Ischemia and Survival Intervals. *Invest. Ophthalmol Vis Sci.* 37: 2002-2014, 1996.



49. Shelton DL, Sutherland J, Gripp J, Camerato T, et al. Human trks : Molecular Cloning, Tissue Distribution, and Expression of Extracellular Domain Immuno adhesins. *J. Neurosc.* 15: 477-491.
50. Schwartz M, Belkin M, Yoles E, Solomon A. Potential tratment modalities for glaucomatous neuropathy: neuroprotection and neurodegeneration. *J. Glauc.* 5:427-432, 1996
51. Smith RE, Perffer RL Jr, Wilok PB. Pathology of canine glaucoma. *Conference Proocedings of the third Annual Meeting, ACVO, 61-75, 1993.*
52. Stewart WC, Charleston MD. Update on new glaucoma drugs heades your way. *Arch. Ophthalmol.* 105-116, 1996.
53. Tatton WG, Chalmers-Redman RME, Sud A, Podos S, et al. Maintaining Mitochondrial Membrane Impermeability: An Opportunity for New Therapy in Glaucoma? *Sc. Ophthalmol.* 45: 5277-5282, 2001
54. Tomei Ld, Cope OF. Apoptosis: The molecular basis of cell death. *Cold Spring Harbor Press.* 18-25, 1991.
55. Vecino E, Caminos E, et al. Inmuno histochemical Distribution of Neurotrophins and their Receptors in the Rat Retina and the Effects of Ischemia and Reperfusion. *Gen. Pharmac.* 30:305-314, 1998.
56. Wahlin KJ, Campochiaro PA, Zack DJ. Neurotrophic factors cause activation of intracellular signaling pathways in Muller cells and other cells of the inner retina, but not the photoreceptors. *JOVS.* 41 3:927-936, 2000

57. Weinreb RN. Questions and answers following session I. Location of injury and mechanism of retinal ganglion cell death. *Survey Ophthalmol.* 45 Supp 3, 2001

58. Weinreb RN, Levin LA. Is neuroprotection a viable therapy for glaucoma? *Arch. Ophthalmol.* 117:1540-1544, 1999.

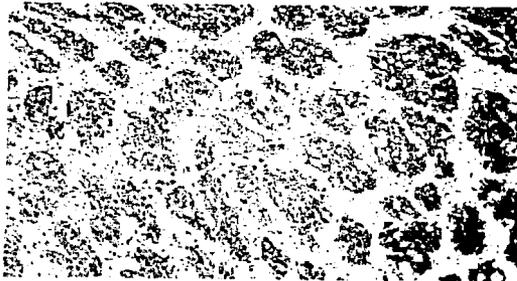
59. Williams LW, Gelatt KN, Gum GG, Samuelson DA, Merideth RE. Orthograde rapid axoplasmic transport and ultrastructural changes of the optic nerve. Part I. Normotensive and acute ocular hypertensive Beagles. *Glaucoma.* 214-221, 1983.

60. Zhivitivsky B, Suzanne C, Adams MJ. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Sc.* 281: 1322-1326, 1998

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Retina ojo normal. Marcaje para FNDC



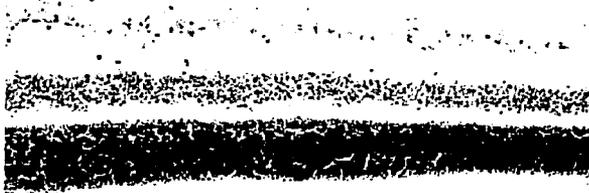
Nervio óptico, ojo normal. Marcaje para FNDC.



Retina, ojo glaucomatoso. Marcaje para FNDC.



Retina, ojo glaucomatoso. Marcaje para FNDC.



Retina, ojo normal. Marcaje para FNDC.



Nervio óptico, ojo normal. Marcaje para TrkB..



Retina, ojo glaucomatoso. Marcaje para TrkB.



Retina, ojo glaucomatoso. Marcaje para TrkB.