

116749



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCION Y
DE LA SALUD ANIMAL**

**DETERMINACION DE APOPTOSIS EN RETINA EN
PERROS CON GLAUCOMA PRIMARIO.**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN
CIENCIAS

P R E S E N T A

SANDRA LUZ ROBLES MONROY

TUTOR: GUSTAVO ADOLFO GARCIA SANCHEZ

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO

2003

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

A MIS PADRES:

LES DEDICO ESTA TESIS POR QUE USTEDES SON MI FUERZA Y MI ESPERANZA, MI AMOR Y MI VIDA, POR QUE AHORA MAS QUE NUNCA LOS VALDORO POR QUE PRONTO APRENDERE A AMAR COMO USTEDES ME AMAN, POR QUE ES UN PASO MAS EN MI FORMACION, EN LA CUAL SIEMPRE HAN ESTADO CONMIGO ALENTÁNDOME Y APOYÁNDOME, CUMPLIMOS UNA META MAS, LOS AMO.

A MI ESPOSO, ARO. EDUARDO CARDOSO GARCIA:

POR ESTAR "SIEMPRE" A MI LADO, POR TU GRAN APOYO EN CADA PASO DE MI VIDA Y DE MI FORMACION, POR AMARME TANTO, POR SER LA ESENCIA DE MIS SUEÑOS, EL HOMBRE DE MI DESTINO, EL AMOR DE MI VIDA, TE AMAMOS.

A MIS ABUELOS (QPQ):

A MI MAMA TOÑA, PAPA FIDEL Y AL ABUELO LUIS, SIEMPRE LOS TENGO PRESENTES, PORQUE SIEMPRE ESTAN CONMIGO, LOS AMO.

A MIS HERMANOS, CUÑADOS Y SOBRINOS:

APOLINAR, BETTY, ANNA, REYNA, BRUNO Y TOÑO POR DARME TANTO APOYO LO QUE QUIERO.

JOSEFINA, FEDE Y RICARDO CON MUCHO CARIÑO.

IVANCITO, MOÑE, ALETA, PEQUE, RULIS, YEYO, RICHY, NOEL, LUIGI Y EVE POR AMARME TANTO, LOS ADORO.

ESPECIALMENTE A REYNA, BRUNO, BETTY Y A MIS PRINCESITAS POR DARLE ESE TOQUE ESPECIAL A MI VIDA.

A MI TUTOR, DR. GUSTAVO ADOLFO GARCIA SÁNCHEZ:

DOC. LE DEDICO ESTA TESIS CON TODO MI CORAZON YA QUE SIN SU AYUDA, APOYO Y ENSEÑANZA NO SE HABRIA REALIZADO, LO QUIERO MUCHO.

A MI AMIGO, PROFESOR Y JURADO, DR. GILBERTO CHAVEZ GRIS:

CON MUCHO CARIÑO Y NO MENOS RESPETO, NO SE QUE HABRIA HECHO SIN TI, GRACIAS POR TODA TU AYUDA (QUE FUE MUCHÍSIMA) Y POR HABERME BRINDADO TU AMISTAD.

A MIS AMIGOS:

ASSENETH Y FRANCISCO, CON MUCHÍSIMO CARIÑO, ESPECIALMENTE A TI AMIGUITA POR ENSEÑARME OFTALMO Y BRINDARME TU AMISTAD, TE QUIERO MUCHO.

A SIMONE, AMIGUITA POR APOYARME TANTO EN OFTALMO Y POR SER MI AMIGA, TQM.

A RAMON, SON MUCHOS AÑOS DE CONOCERNOS (Y TODAVÍA TE QUIERO), CON MUCHO CARIÑO.

CON MUCHÍSIMO CARIÑO A **SILVIA, BETO Y A MI SOBRINITA BETTINA,** LQM.

A LUIS POR TU APOYO, GRACIAS.

PRINCIPALMENTE LES DEDICO ESTA TESIS A **DIOS** POR DARME UNA NUEVA OPORTUNIDAD DE VIVIR, TE PROMETO SER FELIZ, TE AMO, Y A UNA PERSONITA QUE ES MUY PEQUEÑA TODAVÍA PERO A LA CUAL AMO YA CON TODO MI CORAZON Y MI ALMA, ME MUERO DE GANAS DE CONOCERTE, YA QUIERO TENERTE EN MIS BRAZOS AMOR, GRACIAS DIOS MIO POR DARME ESTA BENDICIÓN.

2

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

AGRADECIMIENTOS

A MI TUTOR DR. GUSTAVO ADOLFO GARCIA SANCHEZ POR CREER EN MI, Y POR HABERME ENSEÑADO LO BELLA QUE ES LA OFTALMOLOGIA.

A MI COMITÉ TUTORAL Y MI JURADO:

DR. FRANCISCO TRIGO TAVERA, DR. GILBERTO CHAVEZ GRIS, DR. CIRIACO TISTA OLMOS Y DR. JOAQUIN AGUILAR BOBADILLA.

GRACIAS PORQUE CON SU AYUDA Y DEDICACIÓN ME BRINDARON LA OPORTUNIDAD DE DAR UN PASO MAS EN MI FORMACIÓN, YA QUE CON SUS PUNTOS DE VISTA ENRIQUECIERON EL PRESENTE TRABAJO.

ESPECIALMENTE AL DR. CHAVEZ GRIS POR PERMITIRNOS REALIZAR EN LAS INSTALACIONES DE PATOLOGÍA DE LA FMVZ LAS INMUNOHISTOQUIMICAS.

AL DR. ABELARDO RODRÍGUEZ DE LA ASOCIACION PARA EVITAR LA CEGUERA EN MÉXICO, GRACIAS DOCTOR POR SU AYUDA INVALUABLE E INCONDICIONAL PARA REALIZAR LOS RESULTADOS DE ESTE TRABAJO.

AL DR. CERVANTES DE LA FMVZ POR APOYARME PARA TERMINAR MI POSGRADO.

A LOS TÉCNICOS DE PATOLOGÍA DE LA FMVZ SR. LUIS Y A LUPITA POR SU APOYO PARA REALIZAR LAS LAMINILLAS.

AL DR. GUIZAR DE CAMINA, GRACIAS DOCTOR POR PRESTARNOS SUS INSTALACIONES PARA REALIZAR PARTE DEL TRABAJO.

AL DR FERNANDO OSNAYA DE LA FES-C POR SU APOYO PARA LA TERMINACIÓN DE ESTA TESIS.

A MINERVA DE LA SECRETARIA DE POSGRADO DE LA FES-C, POR MANTENERME SIEMPRE INFORMADA.

DETERMINACION DE APOPTOSIS EN RETINA EN PERROS CON GLAUCOMA PRIMARIO

INDICE	I
I RESUMEN	IV
II ABSTRACT	V
III INTRODUCCIÓN	1
1. Estructura Anatómica del Ojo	2
1.1 Túnica Fibrosa	2
1.2 Túnica Vascular	2
1.3 Túnica Nerviosa	2
2. Histología de la Retina	2
2.1 Epitelio Pigmentario de la Retina	3
2.2 Capa de Fotorreceptores	3
2.2.1 Bastones	3
2.2.2 Conos	4
2.3 Membrana Limitante Externa	4
2.4 Capa Nuclear Externa	4
2.5 Capa Plexiforme Externa	5
2.6 Capa nuclear Interna	5
2.6.1 Células Bipolares	5
2.6.2 Células Horizontales	5
2.6.3 Células Amacrinas	5
2.6.4 Células de Müller	6
2.7 Capa Plexiforme Interna	6
2.8 Capa de Células Ganglionares	6
2.8.1 Células Ganglionares	6
2.8.2 Células correspondientes a vasos sanguíneos	6
2.9 Capa de Fibras Nerviosas	6
2.10 Membrana Limitante Interna	7
3. Nervio Óptico y Lamina Cribosa	7
4. Glaucoma	9
4.1 Humor Acuoso y PIO	9
4.2 Clasificación	10

4.2.1	Glaucoma Primario	10
4.2.2	Glaucoma Secundario	11
4.3	Diagnóstico	11
4.3.1	Tonometría	11
4.3.2	Gonioscopia	12
4.3.3	Tonografía	12
4.3.4	Oftalmoscopia	12
4.3.5	Fluorangiografía	12
4.3.6	Electroretinografía	12
4.4	Tratamiento	13
4.4.1	Tratamiento Médico	13
4.4.2	Tratamiento Quirúrgico	14
5.	Apoptosis en Glaucoma	14
5.1	Cambios Morfológicos y Bioquímicos	18
5.1.1	Cambios Morfológicos	18
5.1.2	Cambios Bioquímicos	18
5.2	Caspasas	19
5.2.1	Estímulos y Activación	19
5.3	Genes que Intervienen en la Apoptosis	21
5.4	Importancia de Neurotrofinas, Oxido Nítrico y Endotelinas en la Apoptosis	22
5.4.1	Neurotrofinas	22
5.4.2	Oxido Nítrico y Endotelinas	23
6.	Exitotoxicidad en Glaucoma	25
7.	Autorregulación del Ojo Durante el Glaucoma	26
8.	Métodos de Detección de Apoptosis	29
8.1	Microscopía Electrónica	29
8.2	Tinción con Hematoxilina y Eosina	29
8.3	Tinciones con Fluoresceína	29
8.4	Electroforesis de ADN	30
8.5	Citometría de Flujo	30
8.6	Tinción con Anexina	30
8.7	Inmunohistoquímica	31
8.7.1	Método del Complejo Avidina-Biotina (ABC)	31
8.7.2	Método de Terminal deoxittransferase mediated X – dUTP Nick End Labeling (TUNEL)	32
IV.	JUSTIFICACIÓN	33
V.	OBJETIVOS	33

VI. HIPÓTESIS	33
VII. MATERIAL Y MÉTODOS	34
VIII RESULTADOS	37
IX. DISCUSIÓN	39
X LITERATURA CITADA	42
XI APÉNDICES	51
XII CUADROS	54
XIII FIGURAS	55

I. RESUMEN

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. La mayoría de éstas enfermedades resultan o están asociadas a un incremento en la presión intraocular (PIO), siendo este uno de los factores de riesgo involucrados en la atrofia del nervio óptico. Las CGR pierden su capacidad para desarrollar conexiones sinápticas corticales y mueren por apoptosis, debido al daño primario en el nervio óptico. El objetivo del presente trabajo fue investigar la apoptosis en la retina de perros con glaucoma primario, por medio de técnicas de inmunohistoquímica. Se utilizaron ojos de perros con glaucoma primario el cual clínicamente se determinó por examen oftalmológico, así como examen de fondo de ojo. Se utilizaron 10 perros de raza cocker spaniel, 5 con ojos sanos y 5 con ojos glaucomatosos, se enuclearon los ojos y se prefundieron durante 12 horas en una solución de paraformaldehído al 4%. El tejido fue incluido en parafina y se hicieron cortes de 5µm y se realizaron las técnicas de inmunohistoquímica. Las secciones fueron incubadas con el anticuerpo primario caspasa-3 posteriormente un anticuerpo secundario biotilinado fue adicionado y se reveló por el método del complejo Streptavidina-Biotina-Peroxidasa (ABC) y también se realizó la técnica de TUNEL. En el método ABC la marca fue visualizada en el citoplasma de las células ganglionares en los 5 ojos con glaucoma primario, a diferencia de los ojos normales y el examen de los cortes teñidos con TUNEL, mostró tinción positiva para roturas de ADN cromosómico. Lo anterior nos lleva a confirmar que la muerte de las CGR es mediante ruta de apoptosis, este hallazgo es compatible con trabajos publicados con otros modelos animales. Estos resultados sugieren que el perro podría ser contemplado como un modelo para el estudio de glaucoma en humanos.

PALABRAS CLAVE:

OFTALMOLOGÍA
GLAUCOMA
APOPTOSIS
CASPASA 3

II. ABSTRACT

The glaucoma term its about the final way that a group of the deases, with characteristic optic nerve damage and defect in retinal sensitivity leading to loss of visual and excavated appearance of the optic nerve and by death of retinal ganglion cells (RGC), most of this is are associate increase intraocular pressure (IOP) elevated is known to be a prominent risk factor for developing optic nerve damage in glaucoma. There are evidence that demonstrated decrease in the axonal transport neurotrophins its result dead of RGC due to excitotoxicity and deprivation in neurotrophins. The RGC loss the capacity to develop synaptic connections there by result in apoptotic cell death, for a damage in optical nerve.

The objective for this work, is a research apoptotic in the dogs retinal whit primary glaucoma, we used immunohistochemical technique. We work with dogs eyes whit primary glaucoma wich clinically determinate by ophthalmology exam in this exam we used tonometry, gonioscopy and indirect ophthalmoscope for visualice damage in the optical nerve. We used ten dogs, five with healthy eyes and five with primary glaucoma, they were perfused and enucleated, 12 hours in paraformalehido solution to 4% percent. The tissue was include in paraffin and we cut slices by 5mm then was measured by immunohistochemical. The sections were include in the primary antibody caspase-3 and then a secondary antibody biotinylated was added followed with a Streptavidina-Biotina-Peroxidase (ABC) also used the TUNEL technique. The ABC method display positive cytoplasm in ganglion cells in the five eyes with primary glaucoma, the difference with the normal eyes, with the slices exam with TUNEL; they shown positive coloring to AND fragment. It's confirm (RGC) death can be induced by apoptosis. These research was comparative with o other jobs publicity with other animal models. This results suggested the dog can be contemplated like a model for a human glaucoma study.

KEY WORDS:

OPIHTHALMOLOGY
GLAUCOMA
APOPTOSIS
CASPASE 3

III. INTRODUCCIÓN

El incremento de la presión intraocular (PIO) causa cambios en la retina y en el nervio óptico que resultan en ceguera permanente. Es común encontrar un daño progresivo en las capas internas de la retina principalmente en la capa de células ganglionares (15). El glaucoma se asocia con la reducción del transporte axonal del nervio óptico, compromete la circulación de éste, igual que la muerte de las células ganglionares de la retina (CGR) debido a excitotoxicidad y privación de neurotrofinas (17). El foco del daño neural es en la lámina cribosa de la esclera, la cual ésta constituida por una serie de aperturas en la parte posterior del globo ocular a través de las cuales salen las fibras del nervio óptico hacia la órbita. Al aumentarse la PIO se produce compresión mecánica de los axones así como anomalías microcirculatorias que resultan en la interrupción del transporte axoplásmico, isquemia de los axones, y atrofia. Las células ganglionares de la retina pierden su capacidad para desarrollar conexiones sinápticas corticales y mueren por apoptosis. La muerte celular apoptótica causada por ausencia de neurotrofinas que a su vez es inducida por un flujo axoplásmico retrógrado obstruido a nivel de la lámina cribosa de la esclera, son fenómenos asociados al daño en el nervio óptico observado en el glaucoma (15). 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 (28, 67).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1. Estructura Anatómica del Ojo.

El ojo está compuesto de tres capas o tónicas que rodean y encierran los componentes de refracción y son: Túnica Fibrosa, Túnica Vasculosa y Túnica Nerviosa (7).

1.1 Túnica Fibrosa. Consiste de tejido colágeno denso y se divide en la Esclerótica, la cual es la parte opaca de la túnica fibrosa y la Córnea que representa la cuarta parte de la túnica, sobresale hacia delante, no contiene vasos sanguíneos y constituye la porción transparente de esta. (figura 1).

1.2 La Túnica Vasculosa. También conocida como Uvea, está en contacto con la esclerótica y consta de tres zonas: la Coroides que tapiza la esclerótica desde el nervio óptico casi hasta el limbo seguida por el Cuerpo Ciliar que tiene forma triangular como una zona engrosada opuesta al limbo y el Iris que está suspendido entre la córnea y el cristalino, se inserta hacia la periferia en la esclerótica y en el cuerpo ciliar; la abertura que tiene al centro se conoce como Pupila. (figura 1).

1.3 La Túnica Nerviosa o Interna. Contiene las células fotorreceptoras y se conoce como Retina. La retina es la capa interna sensible a la luz que tapiza el segmento posterior del globo ocular. Es una prolongación del cerebro al que permanece conectada por el nervio óptico Su cara interna está en contacto con el humor vítreo y su cara externa con la coroides; está finalmente adherida a la *ora ciliar retinae* así como alrededor del margen del disco óptico (*papila óptica*) (20,80). La retina se mantiene en el lugar mediante la presión del humor vítreo y líquido acuoso (82). (figura 1)

2. Histología de la Retina

Histológicamente, la retina está formada por 10 capas, nueve de las cuales forman parte de la retina sensorial interna y la última capa es el soporte (epitelio pigmentario). La retina

óptica se extiende del disco óptico a la *ora ciliar retinae*, en la cual se reduce a 2 capas celulares epiteliales del cuerpo ciliar, al ser un órgano sensorial muy especializado consta de una unidad sensora de tres neuronas, que procesa el estímulo y lo envía al cerebro para la respuesta visual. Las 10 capas de adentro hacia fuera son: epitelio pigmentario de la retina (EPR), capa de fotorreceptores, membrana limitante externa, capa nuclear externa, capa plexiforme externa, capa nuclear interna, capa plexiforme interna, capa de células ganglionares, capa de fibras nerviosas y membrana limitante interna (31,76,79). (figura 1)

2.1 Epitelio Pigmentario de la Retina (EPR)

Es la capa mas alejada de la retina, está pigmentada en la parte no-tapetal del fondo dando un color café homogéneo a esta área (79). Sus células son cúbicas y tienen núcleos parabaesales y gránulos pigmentados dispuestos centralmente. Los procesos celulares alargados se extienden entre los fotorreceptores; el contacto estrecho de las células pigmentadas con los fotorreceptores es necesario para la síntesis del pigmento visual. Las células epiteliales pigmentadas constituyen un sitio de almacenamiento de vitamina A (7).

Las células del EPR, se organizan como una sola capa de células que reposan sobre una membrana basal. Se caracterizan por la presencia de gránulos de melanina en su citoplasma.

2.2 Capa de Fotorreceptores

Consiste de segmentos internos y externos de los conos y bastones (76). Son células neuroepiteliales modificadas para recibir, transducir así como transmitir el estímulo visual (7).

2.2.1 Bastones

Los bastones son más sensibles a la luz y al movimiento. Son de importancia especial para la visión en la oscuridad (82). Estas células se forman de: un segmento externo, un cilio de conexión, un segmento interno, fibra externa del bastón, pericarion, fibra interna del bastón y esférula del bastón. El segmento externo es un

proceso celular alargado que contiene muchas láminas de doble membrana y el pigmento visual "rodopsina" (7).

2.2.2 Conos

Son similares a los bastones y poseen láminas segmentarias externas, que contienen "yodopsina". Los cilios de conexión están constreñidos y tanto el segmento interno como el externo tienen apariencia en forma de cono. Un cono contiene cromatina tan densa como la de un bastón; los cuerpos celulares se localizan en la capa nuclear externa (7). Los conos son usados para la discriminación del color, la visión con la luz brillante y la visión focal aguda (47).

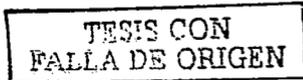
Junto con los conos y bastones encontramos cuatro tipos de neuronas: Células Bipolares, Células Ganglionares, Células Horizontales y Células Amacrinas.

2.3 Membrana Limitante Externa

Los segmentos internos de la capa de células visuales son separados del núcleo de los fotorreceptores por esta membrana. Compuesta de las densidades de la unión celular y las adherencias zonulares que están firmemente atadas al segmento interno de conos y bastones por las células de Müller. Su función es ayudar a mantener la localización del núcleo del fotorreceptor lejos del alto metabolismo del segmento interno, reduciendo el potencial del daño oxidativo (31).

2.4 Capa Nuclear Externa

Contiene el soma de los cuerpos celulares de los fotorreceptores. La capa nuclear externa se adelgaza gradualmente en la retina periférica y la densidad de los conos y bastones disminuye. Las estructuras adicionales de esta capa son: fibras de conos y bastones externas, axones de conos y bastones además de los procesos de las células de Müller. Los axones de los núcleos de conos y bastones se extienden dentro de la capa plexiforme externa para hacer sinapsis con las células bipolares y horizontales (31).



2.5 Capa Plexiforme Externa

Compuesta de las extensiones axonales de los fotorreceptores encerrados en el citoplasma de las células de Müller, para una expansión sináptica con las dendritas de las células bipolares y horizontales (79).

2.6 Capa Nuclear Interna

Compuesta por el soma de las células bipolares, horizontales, amacrinas y células de Müller. Las neuronas en esta capa mantienen conexiones entre la capa de células visuales y la capa de células ganglionares; estas células envuelven la modificación e integración del estímulo (31).

2.6.1 Células Bipolares

Conectan con las terminaciones sinápticas de los fotorreceptores y transmiten las señales hacia las células ganglionares. Presentan un cuerpo celular situado en la capa nuclear interna desde donde parten una expansión externa, dendrítica que se dirige hacia la capa plexiforme interna o axón, más larga que termina a nivel de la capa plexiforme interna haciendo sinapsis con las células ganglionares (46).

2.6.2 Células Horizontales

Son las mediadoras de las interacciones laterales entre los fotorreceptores y las células bipolares.

También responden a la luz con una hiperpolarización, pero a la vez existen sinapsis recíprocas desde las células horizontales hacia los fotorreceptores. Estas sinapsis hacen que la información de las redes de células horizontales, que se encuentran extensamente acopladas a través de contactos eléctricos que realizan una suma especial de los estímulos colaborando en la organización centro-periférica de los campos receptores de las células ganglionares (46).

2.6.3 Células Amacrinas

Estas células presentan un cuerpo celular situado en la capa nuclear interna. No reciben conexiones directas de los fotorreceptores, sino solo de células ganglionares y retroalimentando también a las células bipolares. Por lo tanto, forman la vía de asociación lateral a nivel de la plexiforme interna (46).

2.6.4 Células de Müller

Las células de Müller son células gliales especiales, cuyos núcleos se sitúan en la capa nuclear externa y cuyas prolongaciones se extienden a través de todas las capas, desde la limitante externa a la limitante interna. La membrana limitante externa esta formada por uniones adherentes entre estas células de Müller y los segmentos internos de los fotorreceptores (46).

2.7 Capa Plexiforme Interna

Compuesta de los axones de las células bipolares, horizontales y amacrinas y las dendritas de las células ganglionares. Ocurriendo numerosas sinapsis; estas conexiones laterales entre células coordinan e integran la función retiniana (79).

2.8 Capa de Células Ganglionares

Contiene las células ganglionares y neurogliales y vasos sanguíneos retinianos, y consiste de una sencilla capa de células, excepto en el área central y visual (31).

2.8.1 Células Ganglionares

Poseen un cuerpo celular voluminoso y ramificaciones dendríticas que forman sinapsis a nivel de la plexiforme interna con las terminaciones de las células bipolares y amacrinas. Su axón se sitúa a nivel de la capa de fibras nerviosas y sólo se mieliniza a nivel del nervio óptico, por fuera ya del globo ocular. Este axón llega hasta el cuerpo geniculado externo, donde ocurre la siguiente sinapsis visual (46).

2.8.2 Células correspondientes a vasos sanguíneos

Estos vasos se pueden encontrar a nivel de casi todo el espesor de la retina, desde la capa de fibras del nervio óptico hasta la capa plexiforme externa e incluso la capa nuclear externa (46).

2.9 Capa de Fibras Nerviosas

Los axones de las células ganglionares se unen en esta capa, estos axones no están mielinizados y se dirigen al disco óptico. Los astrocitos se caracterizan por un cuerpo celular aplanado y una serie de procesos radiales llenos de filamentos intermedios; se

encuentran casi exclusivamente a nivel de la capa de fibras del nervio óptico. Su morfología cambia según su localización, de manera que pasan de ser muy elongadas a nivel de la retina central a una morfología estrellada a nivel de la retina periférica (31, 46, 76).

2.10 Membrana Limitante Interna

Formada por la fusión de las terminaciones de las células de Müller. En la sustancia interna vítrea de estas expansiones, una parte de la membrana basal comprende la membrana limitante interna con la contribución de remanentes de la inserción de fibrillas vitreales (31).

3. Nervio Óptico y Lámina Cribosa

El nervio óptico no es un verdadero nervio craneal sino un tracto de materia blanca procedente del diencefalo compuesto principalmente de axones de las células ganglionares de la retina (CGR) (16). Las CGR y los axones del nervio óptico proveen la única conexión entre los fotorreceptores (FR) 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 (40). Los axones del nervio óptico consisten en 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, y en forma retrógrada desde su sinapsis en el SNC hacia el cuerpo de las CGR (16, 17, 28).

La lámina cribosa de la esclera es una estructura constituida por una serie de placas de tejido conectivo delimitadas por astrocitos, y organizadas en forma perpendicular a los axones nerviosos. 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 PIO (40). 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 esclera, lo cual resulta en la rotación, compresión, colapso de los poros y canales laminares de tal forma que tanto el flujo axoplásmico anterógrado como retrógrado del nervio óptico se reduce para finalmente bloquearse, causando la muerte por apoptosis de las CGR (16, 17, 40, 66, 74).

Los astrocitos representan el tipo de células gliales más importante en la lámina cribosa y en la región prelaminar del nervio óptico, ya que son éstos los principales productores de matriz extracelular capaces de expresar proteínas fibrilares ácidas y moléculas de adhesión celular que moderan la interacción de substratos celulares. Bajo condiciones de elevación en la PIO se observan astrocitos reactivos los cuales pierden sus procesos celulares e inician la síntesis de diferentes moléculas en respuesta al estrés inducido por las fuerzas mecánicas del glaucoma. Entre éstas moléculas se incluyen factores de crecimiento, citocinas, moléculas de adhesión celular y enzimas capaces de degradar o favorecer la síntesis de la matriz extracelular ó la activación de canales iónicos. Cualquiera de éstos eventos puede llevar directa o indirectamente a una pérdida axonal progresiva, así como a un daño en la MEC el cual es acumulativo e irreversible lo cual incrementa la susceptibilidad a futuros ataques de PIO elevada. Durante el desarrollo de la neuropatía óptica glaucomatosa no existe invasión de células inflamatorias ni formación de cicatrices gliales. Una vez que el daño inicial se presenta, se observa una cascada de eventos que conllevan a la reactivación de los astrocitos, a la presencia de cambios degenerativos en la MEC de la lámina cribosa y finalmente al colapso de las placas cribiformes como la pérdida de soporte axonal (40). El daño a las células ganglionares de la retina y a los axones del nervio óptico puede ocurrir rápidamente en glaucoma de ángulo cerrado, ó progresar lentamente en los glaucomas crónicos de ángulo abierto (15).

4. 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 (14, 61). La mayoría de éstas 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 (17).

4.1 Humor Acuoso y PIO

El segmento anterior del ojo se encuentra ocupado por un líquido transparente, relativamente libre de células conocido como humor acuoso. El humor acuoso se produce en el cuerpo ciliar y por secreción activa y ultrafiltración del plasma. La enzima anhidrasa carbónica participa en la fase secretoria dependiente de energía de la producción acuosa. La mayoría del humor acuoso fluye de la cámara posterior, a través de la pupila, a la cámara anterior y sale por el ángulo iridocorneal hacia el plexo venoso intraescleral. También existe un porcentaje pequeño de flujo en perros y gatos a través del iris, cuerpo ciliar, coroides y esclera (flujo uveoescleral o ruta no convencional) (figura 2). Este actúa como medio de transporte para los nutrientes necesarios para las actividades metabólicas de la córnea y cristalino, además de ayudar a mantener la forma normal del globo ocular. El transporte intraocular de los elementos nutricionales y de los metabolitos celulares requiere de una circulación constante de humor acuoso, así como el mantenimiento de una PIO constante, la cual resulta del balance entre la formación y la eliminación del humor acuoso. La PIO en el perro es variable, pero en términos generales se acepta un rango entre 15 y 25 mm Hg y en el humano el rango es un poco más bajo de 12 a 22 mm Hg (6, 13, 22, 72).

La elevación de la PIO es solo uno de los signos de la enfermedad, pero se debe evaluar la presencia de otros cambios tales como congestión ocular, midriasis

mantenida encopamiento con atrofia del nervio óptico, con el fin de determinar la necesidad de iniciar la terapia antiglaucomatosa (6, 23, 30).

4.2 Clasificación

Tradicionalmente se ha clasificado al glaucoma como primario y secundario, basándose en la fisiopatología de la obstrucción en el drenaje del humor acuoso que causa la elevación de la PIO.

4.2.1 Glaucoma Primario

Los glaucomas primarios usualmente afectan ambos ojos, son hereditarios y se desarrollan en los primeros días de vida en el individuo (59, 71). El glaucoma primario incluye a todos aquellos casos en los cuales no existe desorden ocular o sistémico asociado que cause una resistencia incrementada al drenaje de humor acuoso. Dentro de las clasificaciones de glaucoma primario, la más aceptada se refiere a la existencia de un ángulo cerrado en el cual la resistencia incrementada al drenaje se produce a causa de una obstrucción de la porción periférica del iris sobre la red trabecular, lo que produce un aumento de tensión brusco, en humanos se presenta con gran dolor, disminución de la visión con sensación de náuseas y vómito es urgente por la lesión del nervio óptico que es inmediata (figura 3). También existe un ángulo abierto que se estrecha progresivamente, en el que se da una incapacidad de flujo a través de las redes trabeculares y los plexos venosos, en humanos se presenta de una forma lenta sin producir síntomas que la persona que lo sufre sea capaz de detectar (figura 4). También se ha descrito la existencia del glaucoma goniodisgénico, en el cual la malformación del ángulo de drenaje es congénita se asocia generalmente a la presencia de ligamentos pectíneos displásicos y cierre del ángulo iridocorneal (13, 14, 22, 30, 55, 81).

En Medicina Veterinaria la incidencia de glaucoma canino con alteraciones primarias del ángulo iridocorneal ocurre principalmente en perros de raza pura (se han descrito en 43 razas diferentes). En la mayoría de las razas, la elevación de la PIO comienza entre uno y tres años de edad, evoluciona rápidamente ocasionando

pérdida total de la visión entre los 6 y 7 años, aún cuando se intenten diferentes tipos de terapia tanto medica como quirúrgica (13, 39, 53).

Las razas Cocker Spaniel, Bassett Hound, Beagle, Boston Terrier, Dálmata, Poodle miniatura, Siberian Husky y Sharpei tienen una alta predisposición a presentar glaucoma primario. En el caso de los perros de raza Beagle existe glaucoma primario de ángulo abierto con una presentación crónica, insidiosa y bilateral que aparece entre los 2 y 3 años de edad en ambos sexos. Es transmitido por herencia autosómica recesiva y ha sido estudiado ampliamente para definir los cambios bioquímicos y estructurales del ángulo iridocorneal por su similitud con el glaucoma primario de ángulo abierto de los humanos (6, 22, 32, 35, 45).

4.2.2 **Glaucoma Secundario**

Los glaucomas secundarios generalmente se asocian con alteraciones oculares o sistémicas los cuales directamente son responsables de una baja eliminación de humor acuoso (37). El glaucoma secundario puede ser unilateral o bilateral, genético y/o adquirido y debe ser manejado y tratado de acuerdo con la etiología. Son comunes en cataratas, luxación de cristalino, sinequias periféricas, iridociclitis, iris bombé intraocular y reclusión/oclusión de la pupila.

4.3 **Diagnóstico**

Varios procedimientos son invaluable para el diagnóstico y valoración del tratamiento del glaucoma, sin embargo la tonometría, la gonioscopia, la tonografía, la oftalmoscopia, la fluorangiografía y la electroretinografía resultan indispensables (6, 14, 32, 70, 71).

4.3.1 **Tonometría**

La tonometría se define como la estimación de la PIO, la cual debe de realizarse a través de la deformación del globo ocular y obteniendo la medición de la fuerza responsable de esta deformación con la presión dentro del globo ocular (69, 75). La PIO se puede estimar por compresión digital por tonometría de Schiotz o por

tonometría de aplanación. La PIO canina y felina normal es de 15 a 25 mm Hg, mayor de 30 mm Hg se considera patológica.

4.3.2 Gonioscopia

La gonioscopia se basa en la utilización de los rayos luminosos que se refractan del ángulo iridocorneal en ángulo oblicuo, de tal forma que son visualizados mediante el uso de un goniolente especial que neutraliza el poder de refracción de la córnea y permite observar el ángulo iridocorneal (72, 79). La gonioscopia se indica en ojos glaucomatosos, quistes del iris, anomalías congénitas del ángulo, sinequias anteriores periféricas, neoplasias y lesiones traumáticas del segmento anterior.

4.3.3 Tonografía

La tonografía es un medio de diagnóstico que permite estimar 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 durante un tiempo que varía de 2 a 4 minutos (6,30, 32, 39, 72, 79).

4.3.4 Oftalmoscopia

Mediante la oftalmoscopia ya sea directa o indirecta, se puede realizar la observación del fondo de ojo por medio de una lente de aumento y una fuente de luz (6, 13, 32, 39).

4.3.5 Fluorangiografía

La fluorangiografía ha sido utilizada para estudiar la circulación retiniana mediante la inyección de colorantes intravenosos como la fluoresceína que además es utilizada para investigar la potencia retiniana y coroidal, la permeabilidad y flujo vascular y las anomalías en la pigmentación del fondo ocular (6, 30, 32).

4.3.6 Electroretinografía

La electroretinografía (ERG) se basa en la evaluación de los potenciales eléctricos generados por la retina después de la estimulación eléctrica. La ERG depende de la reacción de los diferentes tipos de células retinianas, que se extienden desde el epitelio pigmentario hasta la capa nuclear interna de la retina. El límite de resolución de la visión se define como el punto de umbral o el menor tamaño de un objetivo que puede ser detectado por un individuo bajo ciertas condiciones. Como

alternativa la ERG representa una técnica adecuada de evaluación para función visual en animales. La ERG por medio de luz de "flash" permite evaluar las capas externas de la retina, las cuales solo se afectan en etapas tardías de glaucoma (35, 61, 84).

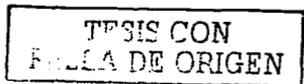
4.4. Tratamiento

Los objetivos del tratamiento son mantener la visión y eliminar el dolor, esto, incrementando el flujo acuoso, disminuyendo la producción acuosa y previniendo o retardando el desarrollo del glaucoma en el otro ojo. Se sabe que la terapia para glaucoma debe prevenir las lesiones al nervio óptico; sin embargo, todavía no se conoce otro método para lograr este objetivo más que la reducción de la PIO (2, 11). Actualmente la mayoría de los métodos utilizados para disminuir la PIO están encaminados a inhibir la producción de humor acuoso o a reducir la resistencia al drenaje de éste (2, 23, 31).

4.4.1 Tratamiento Médico

Entre los medicamentos utilizados para el control del glaucoma están los agentes colinérgicos los cuales actúan incrementando la eliminación convencional del humor acuoso al causar contracción del cuerpo ciliar. La policarpina es un agente parasimpaticomimético directo; mientras que el bromuro de demacario y la fosfolina iodada son agentes anticolinesterasa de larga duración. Estos agentes causan la contracción del músculo ciliar al permitir la acumulación de acetil colina o al bloquear la colinesterasa en los receptores muscarínicos de éste (39,33).

Los antagonistas beta adrenérgicos como el meclato de timolol (bloqueador beta no selectivo) y el levobunolol (bloqueador alfa y beta) son los medicamentos mas comúnmente utilizados en humanos con glaucoma y son altamente efectivos en disminuir la PIO en perros y gatos. El efecto hipotensivo del timolol es aditivo al efecto de los inhibidores de anhidrasa carbónica, agentes colinérgicos y simpaticomométicos. El timolol incrementa el flujo retiniano en humanos. Lo cual tiene un efecto de protección en la función del nervio óptico y la retina (3, 32, 35, 89).



4.4.2 Tratamiento Quirúrgico

Cuando la utilización de agentes farmacológicos es incapaz de mantener la PIO en un rango fisiológico, se aconseja el recurrir a algunos de los procedimientos quirúrgicos que permita el encontrar una vía alterna de eliminación del humor acuoso, o bien sea capaz de inhibir su producción. Los procedimientos quirúrgicos pueden ser divididos en aquellos que reducen la resistencia del humor acuoso a su drenaje externo (procedimiento de fistulización o de filtración) y los que reducen su producción por el cuerpo ciliar (procedimientos ciclodestructivos). En la actualidad se han presentado evidencias que sugieren que la cirugía de filtración permite un mejor control de la PIO que la terapia médica, además de permitir preservar los campos visuales así como la agudeza visual cuando se realiza en etapas tempranas (23, 30, 39, 43, 79, 81).

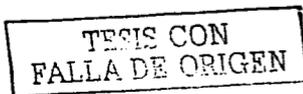
5. Apoptosis en Glaucoma

El fenómeno de muerte celular programada, o apoptosis, es actualmente uno de los más estudiados; su importancia radica en que varias enfermedades, que afectan tanto al hombre como a los animales, son causadas por una alteración en este mecanismo fisiológico tan relevante, a tal grado que sin la existencia de este fenómeno fisiológico, la vida, como actualmente se conoce no sería posible.

La apoptosis es un mecanismo que forma parte de la homeostasis celular y que está involucrado en eventos tales como la diferenciación celular y el desarrollo de diversos organismos pertenecientes a distintas especies, por lo cual se considera evolutivamente conservado (10,12).

Las células mueren por apoptosis en algunos procesos como el desarrollo embrionario durante la morfogénesis y en etapas adultas en el recambio de tejidos y en la respuesta inmune (12,43).

El término apoptosis (*apo*-separar y *ptosis*-caer) fue propuesto y empleado en 1972 por Kerr, Wyllie y Curr en Escocia, se le conocía como necrobiosis o zeiosis, en oposición



a la necrosis, es un proceso de autodestrucción (o muerte) celular programada genéticamente. Escribieron que existen al menos dos formas distintas de muerte celular; la necrótica y la que ellos llamaron apoptosis. La necrótica es rápida y ocasionada por factores traumáticos, que se caracteriza por no estar regulada por genes, producto de lesiones celulares por causas biológicas, físicas o químicas. En este tipo de muerte se afecta regularmente a un conjunto de células mediante un proceso inflamatorio. A diferencia durante la muerte por necrosis, los organelos celulares se hinchan, lo que provoca un aumento en el volumen celular, que no sucede en la apoptosis, ya que en ésta existe una condensación citoplasmática, acompañada de una disminución en el volumen celular (85). La fase final de la muerte por necrosis consiste en que las membranas de los organelos se fusionan y se pierde la integridad de la membrana celular; además se libera el contenido citoplasmático al espacio intersticial y se induce así una respuesta inflamatoria (43,85).

La apoptosis es muy prolongada y morfológicamente distinta, se caracteriza por no liberar material celular al espacio intersticial, lo que evita el proceso inflamatorio; en este tipo de muerte celular programada los organelos permanecen prácticamente íntegros, o bien pueden tener alteraciones (43,85).

En la apoptosis se forman evaginaciones en la membrana celular, para ausentar la inflamación, estas evaginaciones forman estructuras vesiculares, las cuales contienen en su interior material citoplasmático y organelos, se les denomina cuerpos apoptóticos, que son fagocitados por células vecinas o macrófagos (43,85). En la necrosis las enzimas contenidas en los lisosomas presentes en la célula que esta muriendo afectan a las estructuras celulares, en la apoptosis esto no sucede así, ya que primordialmente los componentes celulares son afectados por una familia de proteasa denominadas caspasas (84,86). La apoptosis es un proceso importante en el sistema biológico; es responsable de procesos de desarrollo en algunos seres vivos, como la pérdida de membranas interdigitales en vertebrados superiores, fusión palatal, desarrollo de mucosa intestinal y retinal (58,90). La apoptosis en la embriogénesis origina la plasticidad necesaria para crear estructuras que poseen una funcionalidad limitada y transitoria, que posteriormente desaparecerán o se transformarán en

estructuras diferenciadas. En tejidos adultos se sabe que en ciertos tipos celulares como el epitelio, hepatocitos, epitelio intestinal, espermatozoides, glándula mamaria en lactancia y la involución del timo son regulados por apoptosis, lo que mantiene un equilibrio que determina cuantas células debe tener un tejido. En plantas el proceso de apoptosis es responsable de la diferenciación propia del dimorfismo sexual (43, 58). La apoptosis es un proceso activo, genéticamente determinado y biológicamente significativo, el cual desempeña un papel en oposición a la mitosis, en la regulación del tamaño tisular, en moldear los órganos durante la morfogénesis en mamíferos, en la eliminación de células que son inmunológicamente reactivas contra el propio organismo y en la eliminación de células infectadas o genéticamente dañadas. La anulación de esta ruta alternativa puede conceder a ciertas células, como las cancerosas, la oportunidad de vivir y posiblemente de proliferar en un entorno anómalo, con complicaciones relevantes en la carcinogénesis y en la biología de la metástasis.

La apoptosis se divide en tres fases:

- Fase Efectora. Se caracteriza por el incremento en el contenido intracelular de Calcio libre, debido a un influjo desde el exterior celular de este ion al interior o desde el interior por la liberación de calcio que ocurre en ciertos organelos como las mitocondrias y el retículo endoplásmico. El incremento de Calcio activa a las enzimas presentes, endonucleasas (enzimas cuya función es degradar el ADN) y proteasas (caspasas) además de cambios en la estructura del citoesqueleto celular, sin llegar a su desorganización, produciendo cambios en el tamaño y forma celular (3,12,85).

En estructuras como la membrana celular, que se ve modificada en apoptosis, se produce una pérdida de la simetría. Lo que provoca que la fosfatidilserina, que normalmente está en la capa interior de la membrana, se exteriorice, se debe de tomar en cuenta ya que existen métodos de detección basados en este fenómeno (43).

Las caspasas inactivan proteínas que protegen a las células de la apoptosis como *Bcl-2* y cortan moléculas como la actina, proteína cinasa C y las polimerasas. El incremento de Ca libre intracelular y de proteína *Bax*, permeabiliza a la membrana mitocondrial

perdiéndose el potencial de transmembrana mitocondrial. Esto lleva a más liberación de Ca mitocondrial y a un desarreglo en la síntesis de ADN, ya que hay un incremento en la síntesis de ATP y de esta manera se generan radicales libres que oxidan al ADN (1,29,84,86,91).

Debido a los cambios de la permeabilidad mitocondrial, se produce entrada de agua a su interior para la liberación de citocromo c y de proteínas como el factor inductor de apoptosis (AIF), las cuales activan a las caspasas. La salida de citocromo c se produce a consecuencia de la activación de un canal de la membrana mitocondrial, conocido como poro mitocondrial PT. Este canal no selectivo constituido por proteínas de la membrana mitocondrial interna y externa, permite el paso de moléculas con un peso molecular inferior a 1.5 kilodaltons (kDa). La apertura del mismo, al modificar el potencial de la membrana interna de la mitocondria, ocasiona el desacoplamiento de la cadena respiratoria y la interrupción del transporte de electrones, junto con un incremento en el volumen de la matriz intramitocondrial, entonces ocurre la ruptura de la membrana externa y la liberación de citocromo c (36,48,78).

Según el estímulo que active la muerte por apoptosis, podrán activarse diferentes genes: p53, en el caso de radiaciones gamma; rp-2 y rp-8 cuando los estímulos sean corticosteroides, o la proteína Fas (CD95 o APO-1), en la eliminación de células T maduras al final de la respuesta inmune (4,5,88).

- Fase Degradativa. Es la degradación de ácidos nucleicos, las endonucleasas degradan al ADN, cambios en la membrana celular. Se reorganiza el citoesqueleto perdiendo las estructuras microtubulares y se condensa la cromatina (3).
- Fase de Limpieza. En la cual los macrófagos o células vecinas eliminan todas las células con apoptosis, atraídas por ligandos específicos para ellos y que están presentes en la superficie de las células apoptóticas.

Así, se puede resumir que la muerte celular apoptótica ocurre en dos fases: primero hay una fase de activación durante la cual la célula queda comprometida a morir, seguida por una fase de ejecución, en la cual se pueden observar los cambios de la muerte celular (24, 34).

5.1 Cambios Morfológicos y Bioquímicos

La apoptosis es un proceso de autodestrucción celular programado genéticamente, en el proceso apoptótico se aprecian cambios morfológicos y bioquímicos característicos.

5.1.1 Cambios Morfológicos

Los cambios morfológicos se reconocen por la condensación de la cromatina nuclear, que es el rasgo más característico de la apoptosis, la cromatina se agrega periféricamente debajo de la membrana nuclear, en masas densas bien delimitadas de diversas formas y tamaños; aparición de fragmentos intracelulares envueltos por membranas y compuestos por citoplasma y organelos "empacados" (cuerpos apoptóticos) y fragmentación internucleosomal de ADN. Fagocitosis de células o cuerpos apoptóticos por células adyacentes sanas, ya sea por células del parenquima o por macrófagos.

5.1.2 Cambios Bioquímicos

Los eventos de la apoptosis en la mitocondria son: liberación de citocromo c, cambios en el transporte de electrones, pérdida del potencial mitocondrial de transmembrana y participación de la familia de las proteínas pro y antiapoptóticas. La presencia de citocromo c en el citoplasma activa a una familia de proteasas denominadas caspasas. Estas enzimas actuarán como ejecutoras iniciales de la apoptosis, su acción produce una ruptura de substratos celulares críticos, precipitando así los cambios morfológicos originados por el programa prediseñado de muerte (65, 87).

Reconocimiento fagocítico: Las células apoptóticas expresan *fosfatidilserina* (un fosfolípido) en las capas más externas de su membrana plasmática y en la superficie de los cuerpos apoptóticos asimismo se expresa la *trombospondina* (una glucoproteína adhesiva). Estas alteraciones permiten el reconocimiento temprano de las células apoptóticas por los macrófagos y las células adyacentes sanas para su aclaramiento, realizándose este proceso sin la liberación de componentes proinflamatorios celulares. 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 proteínica (69).

5.2 Caspasas

La maquinaria de apoptosis es regulada por un grupo de proteasas denominadas caspasas, de las cuales hasta la fecha se han identificado 14; estas permanecen en diversas estructuras a nivel celular y pueden estar presentes en mitocondria y citosol principalmente (84,86,92).

Las caspasas son proteasas ácidas que tienen un residuo de cisteína en el sitio activo y que reconocen un residuo de ácido aspártico en el sitio de corte (87). Como muchas otras proteasas las caspasas están presentes en forma de proenzimas o zimógenos (pro caspasas) en células saludables, y deben ser activadas mediante la degradación de determinados sitios ricos en aspartato propios de la proteína, liberando así dos fragmentos de un peso molecular aproximadamente entre 10 y 20 kDa, los cuales posteriormente serán ensamblados en el tetrámero, que formará el complejo enzimático ya activo (84,86).

Las caspasas se agrupan en caspasas ejecutoras (3, 6 y 7) y caspasas iniciadoras (2, 8, 9 y 10), en su estructura las caspasas ejecutoras tienen un propéptido (P) en su extremo amino (NH₂), este extremo es corto, cuya función es degradar proteínas vitales para la célula, también tienen una subunidad grande y una pequeña (SG y SP). Las caspasas iniciadoras además poseen un dominio asociado al receptor Fas, denominado FADD y sus extremos amino (NH₂). Tanto los receptores Fas como TNF tienen dominio de muerte (DED) de interacción proteína-proteína, los cuales se acoplan a las procaspasas vía moléculas adaptadoras (25,84,86,87,92).

5.2.1 Estímulos y Activación

Existen estímulos internos y externos en la célula que se encargan de activar el programa de muerte celular, pueden ser hormonas, proteínas endógenas, radiación gamma, hipoxia, radicales libres, baja en nutrimentos y microorganismos patógenos, entre otros (3,12,43). Las cascadas de proteasas son sistemas de amplificación en los que un estímulo inicial activa a un zimógeno favoreciendo su maduración a una

enzima activa. El primer grupo de enzimas activa a un segundo grupo de zimógenos y así sucesivamente amplificando el estímulo (87).

El mecanismo de activación de caspasas puede darse por dos formas: La autoactivación que se denomina, autocatálisis, o la activación indirecta por otras caspasas ya activas (84, 86).

En una primera fase (autocatálisis) se activan las caspasas denominadas iniciadoras que tienen en su estructura como zimógenos extremos NH₂ (amino) largos, donde se encuentran sitios o dominios específicos: El dominio de reclutamiento de caspasas (CARD) y el dominio efector de muerte (DED), que actuaran en conjunto con otras moléculas que funcionarán como adaptadores: Apaf-1 o DED, los cuales favorecerá, una proximidad, que en combinación con su actividad proteolítica intrínseca, promoverán una activación autocatalítica de las caspasas iniciadoras; posteriormente éstas se encargarán de activar a las caspasas efectoras (activación indirecta) (25,84,86,92).

Las caspasas que sean activadas como iniciadoras pueden variar según el estímulo que induzca apoptosis.

Se han descrito 2 vías de activación. La primera es a través de apoptosis inducida vía receptor, como TNF y Fas, estos receptores contienen dominios de interacción proteína-proteína denominados dominios de muerte en su región intracelular, los cuales se acoplan con pro-caspasas vía moléculas adaptadoras. El sistema que mejor se ha caracterizado es el del receptor Fas, donde la activación de los dominios de muerte causa el reclutamiento de la pro-caspasa 8. Cuando esta pro-caspasa se une al dominio de muerte de la proteína FADD que a su vez se encuentra acoplada al receptor, la caspasa 8 es activada probablemente por autoprocesamiento (52). La segunda vía por la cual las caspasas pueden ser activadas requiere de la translocación del citocromo c de la mitocondria hacia el citoplasma y puede ocurrir en respuesta a un aumento en la producción de radicales libres (estrés oxidativo), un aumento en la concentración de calcio en el citoplasma o la expresión de proteínas proapopticas como *Bax*. Una vez en el citosol, el citocromo c interactúa con factores activadores de apoptosis (Apaf) y forma un complejo que incluye a la pro-

caspasa 9, la cual es entonces procesada a la forma activa por autocatálisis. La función específica de la caspasa 9 parece ser la activación de la caspasa 3 que se considera como la caspasa central en la fase de ejecución (87). (figura 5). El TNF es producido por reactivación de macrófagos, astrocitos y CGR, el TNF se incrementa después de la isquemia y excitotoxicidad en el cerebro, este puede ser un activador de sustancias neurotóxicas tales como óxido nítrico y excitotoxinas. Este TNF es un inductor de apoptosis ya que activa la caspasa 8. Se ha demostrado recientemente que la expresión de TNF es incrementada en la cabeza del nervio óptico glaucomatoso.

5.3 Genes que Intervienen en la Apoptosis

Los genes *Bcl* se sintetizan en la membrana mitocondrial y hay antiapoptóticos y proapoptóticos:

- Antiapoptóticos: *bcl-2* y *bcl-xl*, residen en la membrana mitocondrial externa, disminuyen la permeabilidad de la membrana hasta bloquear el citocromo c y AIF.
- Proapoptóticos: *bad*, *bid* y *bax*, producen una caída del potencial transmembrana, por lo tanto libera citocromo c y AIF, aumentan la permeabilidad de la membrana mitocondrial al citocromo c, son activadores de vías proapoptóticas Fas, TNF y algunas caspasas.

Los genes que controlan éste 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, que son factores de crecimiento esenciales para la supervivencia de las neuronas. La más estudiada es el

Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (FNDC) que es producido por las células cerebrales y transportado por flujo axoplásmico retrógrado hacia la retina. 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 (61). 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 apoptósicas 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 (61). Numerosos estudios han demostrado la habilidad del FNDC y el FCN para atenuar la disfunción o la muerte celular inducida (26).

5.4 Importancia de Neurotrofinas, Óxido Nítrico y Endotelinas en la Apoptosis

5.4.1 Neurotrofinas

Las neurotrofinas que son factores necesarios para el crecimiento y desarrollo de la mayoría de las neuronas son péptidos pequeños que también se conocen como factores neurotróficos, citocinas o factores de crecimiento. Las neurotrofinas actúan uniéndose a receptores celulares específicos, los cuales a su vez estimulan una cascada de eventos moleculares que afectan la función esencial del metabolismo celular. Aunque existen múltiples factores que han sido identificados, solo algunos son necesarios para la vida de las CGR. Uno de éstos es el Factor Neurotrófico derivado del Cerebro (FNDC) el cual es liberado por las células del cerebro al momento del desarrollo de los axones de las células ganglionares. La primera CGR que establece contacto con estas células cerebrales toma el FNDC y lo transporta hacia la retina mediante un transporte axoplásmico retrógrado. Hasta éste momento

las CGR que se desarrollan sin necesidad del FNDC tienen cambios moleculares que hace de las neurotrofinas algo esencial para su supervivencia. Las CGR que fallan en hacer contacto con estas células cerebrales mueren al perder su fuente de neurotrofinas (61).

Las neurotrofinas como el FNDC, el Factor de Crecimiento Nervioso (FCN), la neurotrofina 3 (NT-3) y las neurotrofinas 4 y 5 (NT 4/5), son miembros de una familia de proteínas que se relacionan estructuralmente y que promueven el crecimiento y la supervivencia de las neuronas en el SNC y en el sistema nervioso periférico (8). Todas las neurotrofinas también se unen al receptor $p75^{NTR}$, que es un miembro de la familia de factores de necrosis tumoral cuya función principal es modular la señalización de los receptores *Trk*, así como la de mediar la muerte celular. Se sabe que la co-expresión de $p-75^{NTR}$ y *trkA* en la misma célula lleva a la formación de receptores de alta afinidad así como determina la supervivencia o la muerte celular (9).

5.4.2 Óxido Nítrico y Endotelinas

El endotelio vascular es un activo participante en el mantenimiento del tono vascular y en la regulación del flujo sanguíneo, a través de diferentes rutas miogénicas. Al existir alteraciones en el microambiente endotelial existe una respuesta en la síntesis de diferentes agentes vasoactivos con el fin de mantener un balance entre la vasoconstricción y la vasodilatación. Entre los factores vasoactivos derivados del endotelio se incluyen a los prostanoídes, al óxido nítrico (ON) y a factor vasoconstrictor derivado del endotelio llamado endotelina.

La prostaciclina (I_2) causa un incremento en la generación de AMPc en las células del músculo liso de las paredes de vasos sanguíneos, reduciendo el calcio intracelular y, por lo tanto, induciendo miorelajación.

El ON es un radical libre en forma de gas que actúa como neurotransmisor y llega a tener efectos reguladores (vasodilatación) o neurotóxicos dependiendo de su estado, reducido u oxidado, así como por su concentración. El ON es generado por la

sobreexcitación de receptores NMDA y esta involucrado en la formación de oxirradicales, estrés oxidativo, procesos de apoptosis y es capaz de potencializar el daño oxidativo mediado por el ácido quinolínico (18). El ON es sintetizado por las células endoteliales a partir del aminoácido esencial L-arginina bajo la acción de la enzima citosólica sintasa del ON (ONs). Este gas se difunde en las paredes musculares, activando la enzima guanilato ciclasa, y favoreciendo la acumulación de GMPc; esto reduce los niveles de calcio intracelular e induce la cascada de fosforilación y, por lo tanto, la relajación vascular. El ON también afecta los pericitos e induce vasodilatación a nivel capilar, lo cual es capaz de mantener un estado constante de vasodilatación en la circulación ocular (16, 63).

Molecularmente se han identificado 3 distintas expresiones genéticas de ONs : ONs neuronal (nONs o ONs 1), ONs endotelial (eONs o ONs 3) y ONs inducible (iONs oONs 2). Se ha reportado la presencia de ONs 1 y ONs 3 en el nervio óptico de humanos sanos y las 3 expresiones en el nervio óptico de pacientes con glaucoma primario, sugiriendo la inducción de ONs 2 en glaucoma (77).

El ON protege diferentes tipos celulares de la apoptosis incluyendo linfocitos, células endoteliales, eosinófilos, células lineales, folículos ováricos, ciertas neuronas y hepatocitos. Un mecanismo para inhibir la apoptosis con ON, es la supresión de la actividad enzimática de las caspasas. El ON inhibe las caspasas al activar directamente la s-nitrosilación; suprime el proceso proteolítico y la activación de múltiples procaspasas en células intactas, incluyendo la caspasa 3 y la caspasa 8; sin embargo no queda claro si el ON actúa en las caspasas o si bloquea la activación de las procaspasas. El ON también previene otros eventos asociados con la activación de las caspasas incluyendo la pérdida de la membrana mitocondrial y la liberación de citocromo c (51).

Las endotelinas (ET) son pequeños péptidos que están envueltos en la regulación de la PIO y en la modulación de la circulación circular. La ET-1 se distribuye en el tejido ocular y se localiza en humor acuoso, iris, cuerpo ciliar, retina, cornea y

coroides (57, 68). Ejercen una potente acción vasoconstrictora de larga duración al inducir la liberación del calcio intracelular. La ET-1 disminuye el flujo sanguíneo de la cabeza del nervio óptico; mientras que los agentes bloqueadores de los canales de calcio han demostrado inhibir la contracción de las arterias de la retina bovina inducida por ET-1 (17,63).

6. **Exitotoxicidad en Glaucoma**

La isquemia retiniana y de la cabeza del nervio óptico junto con la privación de neurotrofinas generada por un bloqueo en el flujo axoplásmico retrógrada hacia la células de la retina, alteran la permeabilidad de las CGR y posiblemente inducen una disfunción en las células de Müller. A partir de estas células se liberan niveles potencialmente tóxicos de glutamato retiniano hacia el medio ambiente celular, mismo que es capaz de inducir un daño secundario en las neuronas y axones celulares que logran escapar al daño primario causado por una presión de perfusión ocular reducida en forma sostenida o intermitente asociada a la elevación en PIO. Como consecuencia de éste medio ambiente tóxico se producen cambios en la concentración extracelular de iones como el K^+ y Ca^{2+} , cambios en la hidrólisis de fosfolípidos, liberación de radicales oxígeno, un incremento en los niveles de opioide, una respuesta inflamatoria, edema y alteraciones metabólicas y de flujo sanguíneo, activación de proteasas intracelulares, incremento en sintasa de óxido nítrico en la cabeza del nervio óptico, acumulación de la proteína p53, apoptosis en fotoreceptores así como en células ganglionares, generación de radicales libres de oxígeno con la subsecuente atrofia y degeneración progresiva del nervio óptico. Los niveles incrementados de glutamato intravítreo encontrados en perros glaucomatosos proveen evidencia al mecanismo exitotóxico e isquémico inductor de la muerte de las CGR y de la atrofia del nervio óptico observado en glaucoma canino (15,74).

Algunos de estos aminoácidos excitatorios como el glutámico, el aspártico y el ácido quinolinico contribuyen al daño neuronal secundario (18,50,73). El ácido glutámico actúa

sobre receptores N-Metil-D-Aspartato (NMDA) provocando la entrada de Na y Ca y salida de K, lo que desencadena la despolarización de membranas celulares con activación secundaria de los canales de Ca y activando segundos mensajeros que liberan más Ca de almacenes intracelulares. El exceso de Ca actúa transformando la enzima Xantina deshidrogenasa a Xantina oxidasa, lo que favorece la producción de oxirradicales y activa las isoformas del óxido nítrico sintetaza dependientes de Ca. El ácido quinolinico es una neurotoxina endógena derivada del triptófano, su neurotoxicidad provoca aumento en la concentración del Ca en el citoplasma, disminuye el ATP, el GABA, aumentando la peroxidación lipídica así como el daño oxidativo (42,49,50).

Algunas evidencias recientes sugieren que la disminución en la PIO no es un paso suficientemente valioso para detener la progresión del daño en las células ganglionares de la retina. Esta pérdida progresiva llega a continuar después de la disminución en la PIO debido al medio ambiente hostil a la retina y el nervio óptico que es creado por las neuronas retinianas degeneradas así como por los cuerpos celulares que fueron dañados al producirse la primera elevación de la PIO. El daño primario al nervio óptico induce la apoptosis de las CGR, misma que se asocia a excitotoxicidad por ácido glutámico, privación de neurotrofinas, acumulación de calcio intraneuronal y formación de radicales de oxígeno libres. Los niveles de glutamato intravítreo ($6.6 \pm 5.6 \mu\text{M}$, niveles normales) se encuentran elevados cerca de 6 veces por encima de lo normal en los ojos de perros afectados con glaucoma crónico. Las células ganglionares apoptóticas dañadas, liberan más glutamato lo cual predispone a una degeneración secundaria posterior en las células ganglionares y axones adyacentes que se encuentran sanos (15).

7. Autorregulación del Ojo durante el Glaucoma

El mecanismo de control vascular local encargado de mantener un medio ambiente metabólico en el tejido, sin importar las condiciones que tiendan a bloquear la homeostasis, es llamado autorregulación (63).

En ojos normales es posible observar que una elevación moderada de PIO tiene efectos mínimos sobre el flujo sanguíneo de la retina y el nervio óptico debido a la presencia de un proceso que controla el flujo vascular llamado autorregulación. Esto significa que dentro de un rango normal de presión de perfusión ocular (PPO), una disminución de ésta perfusión generada por un aumento en la PIO inducirá una dilatación de los vasos sanguíneos oculares y por lo tanto mantendrá constantes los niveles de flujo sanguíneo (17). El mecanismo de autorregulación es completado a través de la habilidad del sistema cardiovascular para ajustar la resistencia de ciertos vasos para controlar el diámetro de su lumen (63). El mecanismo de autorregulación es iniciado por fuerzas de tracción ejercidas sobre el músculo liso de la pared vascular, por el efecto del intercambio de viscosidad sanguínea del flujo sanguíneo sobre las células endoteliales, así como por el estado metabólico de las células (17).

La patogenia del glaucoma es todavía desconocida en muchos aspectos, sin embargo existen evidencias que hacen pensar que el glaucoma está asociado con cambios vasculares sistémicos y oculares así como una disminución en la macro y microcirculación ocular (56). Las arterias ciliares posteriores cortas actúan como arterias terminales en el ojo, siendo éstas arterias las encargadas de suplir vascularmente regiones retinianas y coroideas independientes (16). Las áreas de retina y coroideas que reciben nutrición de arterias ciliares adyacentes forman zonas de "mantos vasculares", las cuales bajo condiciones de PIO elevada u oclusión vascular resultan en áreas de hipoperfusión (17). La autoregulación no solo es importante para mantener una presión de flujo sanguíneo y un aporte de nutrientes relativamente constantes, sino que también participa en el mantenimiento de una presión capilar relativamente constante. Además éste mecanismo autorregulatorio se complementa con la habilidad del sistema cardiovascular para ajustar la resistencia de algunos vasos lográndose así mantener un flujo sanguíneo efectivo con mínimos efectos secundarios al elevarse la PIO en ojos normales.

Aunque algunos factores como son la presión de perfusión, la resistencia vascular y la viscosidad sanguínea son determinantes en el control del flujo vascular, existen otros

factores que gobiernan el tono vascular como son los nervios y las hormonas vasoactivas, así como las respuestas endoteliales, miogénicas y metabólicas. Cuando el mecanismo de autorregulación no se encuentra presente en un tejido, cada vez que aparece una disminución en la presión de perfusión se da una reducción lineal en el flujo sanguíneo.

El flujo sanguíneo de la retina y de la porción prelaminar de la cabeza del nervio óptico es autorregulable, altamente sensible a la hipoxia y por lo tanto con gran capacidad de adaptación a cambios en la presión de perfusión ocular (PPO) inducidos por la elevación de la PIO. Las prostaglandinas actúan como mediadores de la vasodilatación incrementando el flujo sanguíneo en el nervio óptico anterior y en la retina en los casos en que se incrementa la pCO_2 . Los flujos sanguíneos de la coroides han mostrado ser relativamente insensibles a los cambios en la concentración de oxígeno, muestran poca adaptación, lo cual los hace altamente sensibles a los cambios de la PIO. Además del efecto de la acetilcolina y la noradrenalina, el control neurogénico de la circulación ocular está mediado por una variedad de neurotransmisores entre los que se incluye a la sustancia P, la colecistoquinina, el neuropéptido Y además del polipéptido intestinal vasoactivo.

La presencia de alteraciones en la capacidad de autorregulación y de flujo sanguíneo en el nervio óptico están asociados con el desarrollo de neuropatía óptica glaucomatosa tanto en perros como en humanos (16). Se ha observado que existen disminuciones proporcionales en el espacio capilar potencial en el tejido neuronal y en el flujo vascular de la zona juxtapapilar de la retina y del anillo neuroretiniano en la medida que se desarrolla la atrofia glaucomatosa. Asimismo, se ha demostrado la disminución en el número de capilares retinianos acompañando al incremento en la pérdida del tejido neuronal. Estos resultados son explicados por un cierre funcional o un estrechamiento de los capilares bajo las condiciones fisiológicas existentes en los pacientes con glaucoma. La hipertensión arterial asociada con una hipotensión nocturna también participa en la atrofia glaucomatosa del nervio óptico (56).

8. Métodos de Detección de Apoptosis

La detección de la apoptosis se realiza por métodos directos e indirectos. Se menciona a la microscopía óptica y electrónica, microscopía de fluorescencia, visualización histoquímica mediante TUNEL, y citometría de flujo entre otros. En el presente trabajo se realizó la técnica de inmunohistoquímica por el método del complejo Estreptavidina-Biotina-peroxidasa (ABC) para detectar la caspasa 3 y la técnica de TUNEL para detectar apoptosis en las CGR.

8.1 Microscopía Electrónica

En este método se hacen evidentes las siguientes características: condensación de cromatina en patrón de media luna, reducción del volumen celular, formación de cuerpos apoptóticos y fagocitosis de éstos por células vecinas, esta técnica se aplica comúnmente en cultivos celulares que han sido sometidos a algún estímulo que induzca apoptosis (43).

8.2 Tinción con Hematoxilina y Eosina

La observación de células teñidas por hematoxilina y eosina (HE) es una técnica que presenta ventajas por ser económica en relación con otras; solo requiere de un microscopio de luz y un microtomo. En ella se usan muestras fijadas en formalina al 10% y procesadas. En esta técnica se observa la cromatina con su patrón de media luna. Asimismo, permite valorar un número mayor de células que con la microscopía electrónica; la desventaja es que confunde la condensación de la cromatina existente en células no apoptóticas de las que están en apoptosis (43).

8.3 Tinciones con Fluorescencia

Se emplean los colorantes Hoechst 33258 o el colorante denominado DAPI, y se identifica fácilmente características como son la condensación de la cromatina y la fragmentación nuclear, asimismo, se evalúan y cuantifican un número considerable de

células. Su desventaja es que es de un costo mayor y que para llevarla a cabo se necesita un sistema de fluorescencia (43).

8.4 Electroforesis de ADN

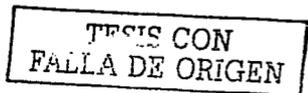
La fragmentación de ADN por geles de agarosa es una de las técnicas más frecuentemente utilizadas para detectar el fenómeno de apoptosis. Las células o tejidos que se destinen a este ensayo deben ser tratadas tanto física (temperatura) como químicamente (enzimas, por ejemplo, proteinasa K) para liberar el ADN, utilizando formol y cloroformo para remover las proteínas. Al obtener el ADN de las muestras,, se someten estas a una electroforesis con geles de agarosa, de esta manera, al ser teñido el ADN presente en el gel con bromuro de etidio, se visualiza el patrón de fragmentación. Esta técnica se caracteriza por ser poco sensible, ya que no detecta cantidades pequeñas de material genético que presenten el fenómeno (43).

8.5 Citometría de Flujo

Permite detectar la intensidad de fluorescencia de las células mediante un dispositivo electrónico y mecánico denominado citómetro. En este aparato es posible analizar grandes cantidades de células en pocos minutos, adicionalmente existen técnicas que se basan en la medición del ADN, evaluación de la morfología, detección de fragmentación e incluso expresión de proteínas propias de apoptosis, que son evidenciadas, medidas y cuantificadas en una población celular, es extremadamente costosa y solo se aplica en suspensiones celulares, lo que es una limitante (64).

8.6 Tinción con anexina

Se basa en alteraciones propias de la membrana celular en las cuales la fosfatidilserina presente en la membrana de manera normal se exterioriza cuando las células están en un proceso de apoptosis, de esta manera la fosfatidilserina se acopla con la anexina. Las desventajas son que se introduce el colorante en cualquier célula que tenga una pérdida de la integridad de la membrana y que no debe ser usado en células que han



sido permeabilizadas o en tejidos incluidos en parafina, y tiene la ventaja de que permite examinar grandes cantidades de células (43).

8.7 Inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica es un método que utiliza anticuerpos seleccionados para identificar antígenos específicos. En ella hay muchos métodos, reactivos y "kits" accesibles.

Un antígeno es una sustancia que al ser introducida en el cuerpo estimula una respuesta inmunológica (producción de anticuerpos). En inmunohistoquímica, el antígeno es la sustancia que tratamos de demostrar. Los anticuerpos son proteínas del suero, inmunoglobulinas, que son producidas en respuesta a una sustancia específica (antígeno). El propósito de los anticuerpos en el organismo es de neutralizar el efecto del antígeno. En el laboratorio histológico se une el anticuerpo con el antígeno en combinación con un marcador visual.

Existen métodos directos, indirectos, de la Peroxidasa-Antiperoxidasa y Complejo Avidina-Biotina (ABC).

8.7.1 Método del Complejo Avidina-Biotina (ABC)

Esta técnica usa tres reactivos: un anticuerpo primario, un anticuerpo secundario que esta químicamente ligado a la vitamina biotina, y un complejo de la glicoproteína avidina que esta ligado a la biotina y peroxidasa. La avidina tiene la habilidad de ligarse con cuatro moléculas de biotina, en forma no inmunológica. Esta fuerte afinidad le da al método excelente sensibilidad.

La peroxidasa (HRP) usada en inmunohistoquímica reacciona con peróxido de hidrógeno, en la presencia de un electrón donante, para formar una molécula coloreada. Algunos ejemplos de los donantes de electrones son: 3,3'-tetracloruro de diaminobencidina (DAB) y 3-amino-9-etilcarbazol (AEC). La DAB produce un producto terminal marrón en el tejido y se cubre con el cubreobjetos montado en resina.

8.7.2 Ensayo de Terminal deoxitferase mediated X-dUTP Nick End Labeling (TUNEL)

Al existir una degradación del ADN por acción de las endonucleasas se generan fragmentos 3', estos constituyen el sustrato para una enzima denominada deoxirribonucleotidil transferasa que cataliza la adición de nucleótidos marcados con fluoresceína, lo que permite observar a las células con un ADN fragmentado y su morfología de forma simultánea en el microscopio. Esta técnica se observa en un microscopio óptico común sin sistema de fluorescencia, es muy costosa (43).

VII. MATERIAL Y METODOS

Se utilizaron 10 perros de raza cocker spaniel, 5 perros con ojos sanos y 5 con glaucoma bilateral. A los 10 perros se les realizó un examen físico general y exámenes para el diagnóstico de glaucoma. El glaucoma primario se diagnosticó por examen oftalmológico, el cual se constituyó por examen con tonometría digital en la cual los dedos índices se colocan sobre los párpados superiores y se presiona gentilmente el globo ocular (figura 6), la presión digital de ambos ojos se realizó una después de la otra percibiendo un abultamiento duro y anormal de ambos globos oculares; en la tonometría por aplanación se instiló una gota de anestésico tópico en ambos ojos, el perro debe permanecer sentado o en posición decúbito lateral o dorsal. Mientras se sostiene al perro no debe tocarse el área de la vena yugular para evitar que aumente la PIO. Los párpados se mantienen abiertos, la cabeza del perro se levanta hasta que los ojos se encuentren en un plano horizontal. Se sostiene verticalmente el tonómetro de aplanación y se coloca en el centro de la córnea hasta que marque, se toman de 2 a 3 mediciones. En estos perros la PIO oscilaba entre los 25 y 35 mm Hg. En la gonioscopia la mayoría de los pacientes toleran el procedimiento con sólo restricción física y anestesia tópica. Los lentes del gonioscopio se colocan sobre la córnea; el espacio entre la córnea y el lente se llena con metilcelulosa 1-2.5%. El ángulo iridocorneal se examina con una luz focal y algo de magnificación. Se usan el oftalmoscopio directo o indirecto, el gonioscopio de mano o las lámparas de hendidura (figuras 7 y 8). Se observa el ángulo en todos los cuadrantes y los ligamentos pectíneos.

En los perros con glaucoma bilateral se observó el ángulo iridocorneal cerrado. Finalmente se les realizó examen de fondo de ojo con oftalmoscopio indirecto en la cual se interpone un lente condensador entre la fuente de luz y el ojo. La luz incidente se condensa para iluminar el fondo. La luz reflejada entonces también es condensada por el mismo lente para formar una imagen virtual, invertida y reversa entre el lente y la fuente de luz. La oftalmoscopia indirecta se ajusta para que la luz se encuentre ligeramente abajo del centro del campo visual del examinador (para reducir el resplandor). Se sostiene gentilmente el hocico del paciente y se posiciona el lente de 3 a 5 cm de la córnea y el párpado superior se

IV. JUSTIFICACION

Se han realizado estudios donde se determina la apoptosis o hallazgos compatibles con la apoptosis en CGR y nervio óptico en ojos con glaucoma humano y en glaucoma experimental, en simios, conejos y ratas, así como examen de caspasa 3 en retinas de rata expuestas a isquemia y presión hidrostática, pero no se ha determinado en el perro, el cual podría ser un modelo de investigación ideal, por su ocurrencia espontánea de glaucoma, ya que los mecanismos patológicos son comparables a los que ocurren el glaucoma humano.

V. HIPOTESIS

La caspasa 3 participa como caspasa ejecutora de apoptosis en las retinopatías glaucomatosas en los perros.

VI. OBJETIVOS

Determinar la apoptosis en retina en perros con glaucoma primario.

Identificar la presencia de caspasa 3 en CGR en ojos glaucomatosos en perros.

retrae. En estos perros se observó excavación del nervio óptico y atrofia retiniana, signos típicos del glaucoma (figura 9 y 10).

Posteriormente, a todos los perros se les realizó la técnica de perfusión (apéndice 1) y se enuclearon los ojos. A los ojos enucleados se les realizó una incisión a nivel corneal y se mantuvieron durante 12 horas sumergidos en solución de paraformaldehído frío al 4% para posteriormente lavarlos con cacodilato de sodio, 4 veces con un intervalo de 15 minutos, y se conservaron o fijaron en formalina amortiguada al 4%, se deshidrataron en el histoquinete (apartado 2) para incluirlos en parafina y realizar los cortes sagitales de 5µm (apéndice 3) y colocar estos cortes en laminillas tratadas con silano (apéndice 4) previamente identificadas.

Detección de caspasa 3 mediante la técnica de inmunoperoxidasa por el método de el Complejo Streptavidina-Biotina (ABC).

Con esta técnica se trabajaron las laminillas con los ojos sanos como testigos (+ y -) y con los ojos glaucomatosos (+ y -), utilizando las soluciones de xileno, acetona, alcohol absoluto, alcohol al 96% y 70% y agua destilada, solución amortiguadora, peróxido de hidrógeno, metanol, hematoxilina de Mayers, resina sintética, suero normal de conejo (SNC_o), suero normal de camero (SNC_a), anticuerpo primario (caspasa 3, IgG policlonal de conejo) a una dilución 1:200, anticuerpo secundario (IgG anticonejo), complejo Avidina-Biotina y revelador (DAB). El procedimiento se especifica en el apéndice 5.

Técnica del TUNEL

Se practicó esta técnica sobre secciones de parafina para verificar apoptosis en CGR, capa de fotorreceptores y capa plexiforme interna; en ojos sanos, testigos y glaucomatosos.

VIII. RESULTADOS

Los 10 ojos con glaucoma resultaron positivos a la inmunohistoquímica por el método ABC, tiñendo en el citoplasma de una o mas CGR indicando caspasa 3 positiva, que es la caspasa ejecutora en la apoptosis (figuras 11, 12 y 13). También resultado caspasa 3 positiva en el nervio óptico excavado (figuras 14). Así también se encontraron células TUNEL positivas en la capa de CGR (figura 15), capa de fotorreceptores (figura 16) y capa plexiforme interna (figura 17).

Utilizando el método ABC se obtuvo un porcentaje de CGR existentes en cada laminilla, ya que difería el número de CGR en cada corte en los ojos con glaucoma primario. En promedio había un 55% de células ganglionares existentes de las cuales un 9.5% tiñeron positivamente a la caspasa 3. De las 10 laminillas que se trabajaron, el número existente de CGR oscilaba entre 20 y 106 CGR, por lo que para obtener el 55% se sumaron las células existentes en cada laminilla y se dividieron entre el número de laminillas; de igual forma el número de CGR positivas oscilaba entre 5 y 17 células por laminilla y para obtener el 9.5% se sumaron todas las CGR positivas y se dividieron entre 10, que es el número de laminillas totales (cuadro 1).

En las laminillas de ojos sanos así como testigos + y -, se observó la estructura normal de la capa de CGR (figura 18) y del nervio óptico (figura 19), no tiñendo, a diferencia de las laminillas con ojos glaucomatosos en las que se observó un menor porcentaje de CGR y una estructura anormal con tinción positiva.

En las CGR de las laminillas con ojos sanos, al igual que en testigos no se visualizó una positividad a caspasa 3 en el citoplasma. Contrariamente la positividad a caspasa 3 fue visualizada en el citoplasma de las células ganglionares en los 10 ojos son glaucoma primario.

El examen de los cortes teñidos con TUNEL que identifica las células apoptóticas mostró CGR con reacción color marrón, que representa la tinción positiva para roturas de ADN cromosómico en los ojos glaucomatosos. (figura 15).

Mediante esta técnica se detectó apoptosis en el 12.8 % de las células ganglionares estudiadas en ojos con glaucoma *versus* el 1.2 % en perros normales.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

IX. DISCUSION

Experimentalmente se han realizado estudios para detectar caspasa 3 y apoptosis en monos, conejos y ratas con glaucoma experimental. Tizel y Martín detectaron apoptosis en retinas de ratas por el método TUNEL, visualizando fragmentación nuclear de ADN y examinaron caspasa 3 con rodamina fluorescente en CGR de ratas. El glaucoma experimental lo obtuvieron por isquemia y elevación de la presión hidrostática (83). Así también Marcuello y col. Estudiaron los cambios apoptóticos observados en la retina de conejos tras una hipertensión ocular producida experimentalmente, ligando vasos episclerales para inducir la hipertensión ocular, ya que la cauterización de dichos vasos produce una disminución del drenaje del humor acuoso que conduce a la hipertensión, isquemia retiniana y muerte celular por apoptosis; emplearon técnicas de microscopía óptica con tinción de hematoxilina y eosina, electroforesis y TUNEL, mostrando en la técnica de TUNEL fragmentos de ADN en las células apoptóticas (54). Quigley y col. también comprobaron que las CGR mueren por apoptosis, realizaron su estudio en monos y conejos produciendo un glaucoma experimental al elevar la PIO a 20 monos y seccionar el nervio óptico a 10 monos y 14 conejos. La PIO la elevaron por ablación con láser de argón e inyectándoles glóbulos rojos en la cámara anterior. En los monos la sección del nervio óptico fue aproximadamente 6mm posterior al globo ocular y en los conejos 4mm. Observaron mediante la técnica de TUNEL y electroforesis cambios morfológicos de apoptosis como es la condensación de cromatina y formación de cuerpos apoptóticos (69). Así mismo, Pease y col. concluyeron que la interrupción del transporte retrograda y la acumulación de TrkB en la cabeza del nervio óptico en modelos de glaucoma experimental, juegan un papel importante en la muerte por apoptosis de las CGR en glaucoma por ausencia de neurotrofinas. Ellos sometieron a 31 ratas a una PIO elevada por 4 horas, conectando una cánula en la arteria femoral y una aguja sin punta a una altura variable en la cámara anterior, a 6 monos los trataron con láser de argón sobre la maya trabecular elevando la PIO y causando daño experimental al nervio óptico, lesión similar a la del glaucoma humano, finalmente a 2 monos les seccionaron el nervio óptico provocando así glaucoma experimental a cada uno de los modelos animales (66). Selles-Navarro y col. comprobaron

en ratas, que las CGR mueren por apoptosis, ya que provocaron isquemia en la retina incrementando la PIO, colocaron sutura 6-0 abajo y arriba del limbo corneoescleral, fijándolo en dirección opuesta hasta que el flujo sanguíneo de la retina se interrumpió completamente. Realizaron un conteo de CGR en ojos testigos y ojos con glaucoma experimental en diferentes tiempos, comprobando que entre los 90 y 120 minutos después de la isquemia, induce la pérdida de aproximadamente 75% a 95% de la población original de CGR (75).

Experimentalmente se han realizado los estudios anteriormente expuestos y de forma natural se han realizado estudios en ojos con glaucoma primario de ángulo abierto en humanos. Kerrigan y col. reportaron muerte de CGR por apoptosis en ojos de humano con glaucoma primario de ángulo abierto por el método TUNEL. En este artículo informaron de muerte celular por apoptosis de CGR en ojos de humanos postmortem. La frecuencia de células positivas a TUNEL fue 1.15, 1.55 y 3.40 por 10 000 células en la capa de células ganglionares por ojo, con glaucoma leve, moderado y severo respectivamente (44). Así mismo en humanos Hotchkiss y col. evaluaron la apoptosis en diferentes órganos por el método TUNEL, H-E y electroforesis, observando por el método TUNEL condensación nuclear y cuerpos apoptóticos, así como también positividad a caspasa 3 por el método ABC en bazo, que fue el órgano con mayor positividad a TUNEL, comprobando que la caspasa 3 esta involucrada en la muerte celular programada (41).

En el presente estudio en las CGR que suponíamos estaban en proceso de apoptosis se visualizo una positividad a caspasa 3 y fragmentación de ADN, lo cual puede indicar que en perros con glaucoma primario hay muerte celular por apoptosis al igual que en el humano con glaucoma primario de ángulo abierto y en monos, conejos y ratas con glaucoma experimental. Se realizo la técnica de TUNEL para observar los cambios morfológicos que ocurren en la apoptosis, como fragmentación de ADN cromosómico y se observo positividad a caspasa 3 por el método ABC en perros con glaucoma primario, que es un glaucoma que se da de forma natural , ya que al igual que en humanos es hereditario.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El perro puede ser un modelo natural para realizar estudios para prevenir el glaucoma en humanos o investigar un mejor tratamiento, y estudiar su procedimiento detalladamente en este modelo animal.

El presente trabajo representa el primer examen de la presencia de apoptosis y caspasa 3 en CGR en perros con glaucoma primario, esto abre nuevas rutas de investigación debido a la alta prevalencia de la enfermedad en humanos.

Se concluye que la muerte de las CGR en glaucoma es por apoptosis, y que la caspasa 3 es la caspasa que ejecuta esta muerte celular, esto es por la obstrucción axonal que se da al aumentarse la PIO, ya que hay reducción del transporte axonal del nervio óptico y afecta la circulación del mismo, por lo que conduce a una isquemia. Esta muerte por apoptosis de las CGR es por excitotoxicidad y ausencia de neurotrofinas, y por vía extracelular(TNF) o por vía intracelular (citocromo c) ya que ambas activan a la caspasa 3 para ejecutar la muerte celular programada o apoptosis.

X. LITERATURA CITADA

1. Adams MJ, Suzanne C. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998; 281:1322-1326.
2. Anderson DR.: Glaucoma: The damage caused by pressure. XLVI Edward Jackson Memorial Lecture. *Am. J. Ophthalmol.* 1989; 108:485-495.
3. Arends MJ, Morris RG, Wyllie AH. Apoptosis: The role of the endonuclease. *Am J Pathol* 1990;136:593-608.
4. Arrowsmith CH. Structure and function in the p53 family. *Cell Death Differ* 1999;6:1169-1173.
5. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 1988;281:1305-1308.
6. Avidan FY.: Uso del implante de silastico en "T" para el control a largo plazo de glaucoma canino. Tesis de Licenciatura. *Fac. de Med. Vet. y Zoot.* UNAM. México, D.F. 1992.
7. Banks J. William. *Histología Veterinaria Aplicada.* 2a ed. México: *El Manual Moderno*, S.A. de C.V., 1996.
8. Barker PA, Morthy RA. Deneve growth factor receptor: a multicomponent system dat mediate deactions of the neurotrophin family of proteins. *Mol. Cel. Biochem.* 110(1): 1-15, 1992.
9. Bibel M, Hoop e, Barde Y/A. Biochemical and functional imperactions between the neurotrophin receptor TrK and p75 NTR. *Embo. J.* 18(3): 616-622, 1999.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

10. Blackstone NW, Green DR. The evolution of a mechanism of cell suicide. *Bioessays* 1999;21:84-88.
11. Brandt JD.: Should we treat ocular hypertension? *Rev. Ophthalmol.* November, 1994.
12. Bright J, Khar A. Apoptosis: programmed cell death in health and disease. *Biosci Rep* 1994;14:677-681.
13. Brooks, DE.: Glaucoma in the dog and cat. *Vet. Clin. North. Ame. (Small Anim. Pract.)*, 20:775-797, 1990.
14. Brooks, DE and Dziezyc, JD: The canine glaucomas: Pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Comp. Cont. Educ.* 1983; 5(4): 292-301.
15. Brooks DE, Garcia GA, Dreyer EB, Zurakowski D, Franco-Bourland RE. Vitreous body glutamate concentration in dogs with glaucoma. *Am J Vet Res* 1997; 58:864-867.
16. Brooks DE, Kamaromy AM, Kallberg ME. Comparative retinal ganglion cell and optic nerve morphology. *Vet Ophthalmol* 2:3-11, 1999.
17. Brooks DE, Kamaromy AM, Kallberg ME. Comparative optic nerve physiology: implications for glaucoma, neuroprotection and neuroregeneration. *Veterinary Ophthalmology* 2:13-25, 1999.
18. Brown S, Hall E. Role of oxygen - derived free radicals in the pathogenesis of shock and trauma, with focus on central nervous system injuries. *JVMA* 200: 1849-1858, 1992.
19. Brubaker RF. Delayed functional loss in glaucoma. *Am J of Ophthalmol* 1996; 121: 473-483.
20. Carlton W. William, Mc Gavin Donald M. Thomson's Special Veterinary Pathology. 2nd edition. *USA: Mosby*, 1995.

21. Chew SJ and Ritch R.: Second annual optic nerve rescue and restoration think tank meeting. *J. Glaucoma*. 1996; 5(2):147-149.
22. Clerc, B: Etiologie et pathogénie du glaucome des carnivores. *Point Vét.* (1990); 22:525-532.
23. Clerc B.: Le traitement du glaucome du chien. *Piont. Vet.* 1991; 23(140):863-873.
24. Cohen G M. Caspases: The executioners of apoptosis. *Biochem J* 326: 1-16, 1997.
25. Coultas L, Strasser A. The molecular control of DNA damage-induced cell death. *Apoptosis* 2000;5:491-507.
26. Croll S, Nancy Y. Expression of BDNF and TrkB as a function of age and cognitive performance. *Brain Res.* 812: 200-208, 1998.
27. Dyce, KM; Sack, WO; Wensing, CJE. *Anatomia Veterinaria. Ed. Méd Vet*, 1991.
28. Fechtner RD, Weinreb RN. *Mechanism survey of ophthalmology* 39:23-42, 1994.
29. Friedberg CE, Walker GC, Siede W. DNA repair and mutagenesis. Washington (DC): *Am Soc of Microbiol Press*, 1995.
30. García, GA. Brooks, DE., Whitley, DR: y Tapia, MH.: Uso de un implante de silástico en forma de "T" colocado en la cámara anterior del ojo, para el control de glaucoma canino. *Cuadriservicio VEPE Purina*, 6:18-29, 1992.
31. Gelatt KN.: *Veterinary Ophthalmic Pharmacology and Therapeutics*. 2nd ed. Baner Springs, *V. M. Publishing*. 1978.
32. Gelatt, KN.: *Veterinary Ophthalmology*. 2nd ed. *Lea and Febiger*. Philadelphia, 1990.
33. Gelatt, KN., Brooks, DE., Miller, TR., Smith, PJ, Sapienza, JS. And Pellicane, CP.: Issues in ophthalmic therapy: The development of anterior chamber shunt for the clinical management of canine glaucomas. *Prog. In Vet and Comp. Opht.* 2:59-64, 1992.

34. Gorman A M, Orrenius S y Ceccatelli S. Apoptosis in neuronal cells: role of caspases. *Neurorep* 9: 49-55, 1998.
35. Graham, SL., Drance, SM., Wijsman, K. Mikelberg, FS. And Duglas, GR.: Nocturnal Hypotension in glaucoma patientes dippers or non-dippers. *Intl Symp on Glaucoma*. Athens, Greece, September 24-25, 1993.
36. Green D. Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1988;281:1309-1312.
37. Gwin, RM: Current concepts in small animal glaucoma, recognition and tratment. *Ver. Clin. Of North. Am. (Small An. Pract.)*, (1980); 10:357-376.
38. Hayreh SS.: Pathogenesis of cuping of the optic disc. *Br. J. Ophthalmol.* (1974);58:863-876.
39. Helper, LC.: Canine Ophtalmology. Ed. *Lea and Febiger*, 4^a. Ed. Philadelphia, 1989.
40. Hernandez MR. And Pena JDO.: The optic nerve head in glaucomatous optic neuropathy. *Arch. Ophthalmol.* 1997; 115:389-395.
41. Hotchkiss R, Swanson P, Bradley MD, Freeman D. Apoptotic Cell Death in patients with sepsis, shock and multiple organ dysfunction. *Crit. Care. Med*, 1999; 27(15) 1230-1253.
42. Kanellopoulos G K, Kato H, Hsu C Y, Kouchoukos N T. Spinal Cord Ischemica Injury (Development of a new model in the rat). *Stroke* 28: 2532-2538, 1997.
43. Kauffmann HS. Apoptosis: pharmacological implication and therapeuticopportunities. San Diego (Ca): *Academic Press*, 1997.
44. Kerrigan LA, Zack DJ, Quigley HA, Pease MD.: TUNEL-Positive Ganglion Cells in Human Primary Open-angle Glaucoma. *Arch Ophthalmol.* 1997; 115:1031-1035.

45. King, TC., Gem, GG. And Gelatt, KN.: Evaluation of topically administered carbonic anhydrase inhibitor in normotensive and glaucomatous beagles. *Am. J. Vet. Res.* 52:2167-2169, 1991.
46. Kolb Helga, Fernández Eduardo and Nelson Ralph. Webvision: La organización de la Retina de los Vertebrados. URL: <http://webvision.med.utah.edu/spanish/fotorre.html> 15 de Febrero de 2002.
47. Komoromy M. Andras, Smith J. Patricia, Brooks E. Dennis. Electroretinography in Dog and Cat. Retinal Morphology and Physiology. *The Compendium* 1998; 20; 3:343-350.
48. Kromer G, Reed J. Mitochondrial control of cell death. *Nature* 2000;6:513-519.
49. Lei B, Adachi N, Nagaro T, Arai T. Nitric Oxide production in the cal field in the gerbil hippocampus after transient fore brain ischemia. *Stroke* 30: 669-677, 1999.
50. Li G, Faroque M, Holtz A, Olsson Y. Apoptosis of oligodendrocytes occurs for long distances away from the primary injury after compression trauma to rat spinal cord. *Acta Neuropathol* 98: 473-480, 1999.
51. Li J, Bombeck C A, Yang S, Kim Y M, Billiar T R. Nitric oxide supresses apoptosis via interrupting caspase activation and mitochondrial dysfunction in cultured hepatocytes. *J of Biol Chem* 274: 17325-17333, 1999.
52. Lindsey JD, Weinreb RN.: Survival and differentiation of purified retinal ganglion cell in a chemically defined microenviroment. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1994.
53. Lugo VT.: Glaucoma en perros y gatos. Tesina de Licenciatura. *Fac. de Med. Vet. y Zoot.* UNAM, México, 1993.

54. Marcuello B., Azua J., Grasa M., Fernández FJ., Álvarez R.: Apoptosis de Células Ganglionares de la Retina en un modelo experimental de hipertensión ocular. Hosp. Univ Miguel Servet, Zaragoza España.
55. Martin CL.: Gonioscopy and anatomical correlations of the drainage angle of the dog. *J. Small Anim. Pract.* (1969); 10:171-184.
56. Michelson G., Langhans MJ. And Groh MJM.: Perfusion of the juxtapapillary retina and the neuroretinal rim area in primary open angle glaucoma. *J. Glaucoma.*
57. Millar J C, Gabelt B T, Hubbard W C. Endothelin-1 effects on aqueous humor dynamics in monkeys. *Acta Ophthalmol Scand* 76: 663-667, 1998.
58. Milligan CE, Schwartz LM. Programmed cell death during development of animals. In editors. Cellular aging and cell death. New York: *John Wiley & Sons*, 1996:181-208.
59. Netland, PA: The persistent problem with low-tension glaucoma. *Rev. Ophthalmol.* May. 1995.
60. Neufeld AH, Hernandez MR. And Gonzalez M.: Nitric Oxide Synthase in the human glaucomatous optic nerve head. *Arch. Ophtalmol.* 1997; 115:497-503.
61. Nickells R W. Retinal ganglion cell death in glaucoma: The how, the why and the maybe. *J of glaucoma* 5: 345-356, 1996.
62. Ofri, RR., Dawson, WW. And Gelatt, KN.: Visual resolution in normal and glaucomatous dogs determined by pattern electroretinogram. *Prog. In Vet. and Comp. Opt.* 3:11-116, 1993
63. Orgul S, Meyer P, Cioff G A. Phisiology of blood flow regulation and mechanisms involved in optic nerve perfusion. *J of Glaucoma* 4: 427-443, 1995.

64. Ormerod MG. Flow cytometry: a practical approach. 2nd ed. Oxford (UK): *Oxford University Press*, 1994.
65. Pacher A. Aspectos de la apoptosis. *Medicina on line* 1: 1-13, 1998.
66. Pease M E, McKinnon S J, Quigley H A, Kerrigan-Baumrind L A, Zack D J. Obstructed axonal transport of BDNF and its receptor TrKB in experimental glaucoma. *Inv Ophthalmol & Vis Sci* 41: 764-774, 2000.
67. Piccolo MG: Excitotoxicity and Neuroprotection in Glaucoma. *Am Ophthalmol Ass.* 1997.
68. Prasanna G, Dibas A, Finkley A, Yorio T. Identification of endothelial converting enzyme-1 in human non-pigmented ciliary epithelial cells. *Exp Eye Res* 69: 175-183, 1999.
69. Quigley,HA., Nickells, R.W., Kerrigan, L. A., Pease, M. E., and Zack, D. J.: Retinal ganglion cell death in experimental glaucoma and after axotomy occurs by apoptosis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1995; 36(5):774-786.
70. Ramirez OL.: Procedimientos y técnicas de diagnóstico de las enfermedades oftálmicas en perros y gatos. Estudio recapitulativo. Tesis de Licenciatura. *Fac. Med. Vet. y Zoot.* UNAM, México D.F. 1984.
71. Renwick, P: Diagnosis and management of glaucoma. *In Practice.* 1995. 10-65.
72. Rouland, JK. An Hache, JC.: Visual-evoked potentials in glaucoma and ocular hipertension. *Glaucoma* 12:77-78, 1990.
73. Santamaría del A, Rios C. El papel del óxido nítrico en el daño oxidativo inducido por el ácido quinolínic en sinaptosomas de cerebro en ratas. *Arch Neurocién* 30: 71-75, 1998.

74. Schwartz M, Belkin M, Yoels E, Solomon A. Potential treatment modalities for glaucomatous neuropathy: neuroprotection and neuroregeneration. *Journal of Glaucoma* 5: 427-432, 1996.
75. 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*. 1996; 37(10): 2002-2014.
76. Severin A. Glenn. Severin's *Vet Ophthalmol* 3rd ed, severin 1995.
77. Shareef S, Sawada A, Neufeld A. Isoforms of nitric oxide synthase un the optic nerves of rat eyes whit chronic moderately elevated intraocular pressure. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40: 2884-2891, 1999.
78. *Since* 281:1309-1312, agosto 28, 1998.
79. Slatyer, DM.: Fundamentals of Veterinary ophtalmology ed. *W.B. Sanders* 2^a. Ed. Philadelphia 1990.
80. Smith Atmore Hilton, Jones Carlyle Thomas. Patología Veterinaria. México: *UTEHA*, 1987.
81. Smith, RE., Perffer, RL Jr. And Wilcock, PB.: Patology of canine glaucoma. *Conference Proceedings of the third Annual Meeting ACVO*. San Diego California, 61-75, 1993.
82. Stades CF., Boevé HM., Neumann W, Wyman H. Oftalmología para el veterinario práctico. Buenos Aires: *Intermédica*, 1999.

83. Tezel G, Martín BW.: Increased Production of Tumor Necrosis Factor- α by Glial Cells Exposed to Simulated Ischemia or Elevated Hydrostatic Pressure Induces Apoptosis in Cocultured Retinal Ganglion Cells. *J Neurosci*. 2000, 20(23):8693-8700.
84. Thornberry AN, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Sci* 1988;281:1312-1376.
85. Tomei LD, Cope OF. Apoptosis: The molecular basis of cell death. New York: *Cold Spring Harbor Press*. 1991.
86. Utz PJ, Anderson P. Life and Death decisions: regulations of apoptosis by proteolysis of signaling molecules. *Cell Death Differ* 2000;7:589-602.
87. Ventura JL, Gómez EO, Zentella A. Caspasas: Una cascada de proteasas implicadas en la muerte celular por apoptosis. *BEB* 18(41):153-165.
88. Wani MA, Zhu QZ, El-Mahdy M, Wani AA. Influence of p53 tumor suppressor protein on bias of DNA repair and apoptotic response in human cells. *Carcinogenesis* 1999;20:765-772.
89. Williams, DE., Nguyen, KD., Shapourifar-Tehrani, S., Kitada, S. And Lee, DA.: Effects of tomlolol, betaxolol and levobunolol on human tenon's fibroblasts in tissue culture. *Invest. Opht. Vis. Sci*. 33: 2233, 1992.
90. Wride MA. Minireview: apoptosis as seen through a lens. *Apoptosis* 2000;5:203-209.
91. Yakes MF, Van B. Mitochondrial DNA damage is more extensive and persist longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proc Nat Acad Sci* 1997;94:514-519.
92. Zhivitivsky B, Samali A, Gahn A. Caspases: their intracellular localization and translocation during apoptosis. *Cell Death Differ* 1999;6:644-651.

XI. APENDICES

APENDICE 1.

Se anestesiaron los perros y la inducción anestésica se lleva a cabo con tiopental sódico a una dosis de 10 mg/kg, previa canalización, se intubaron y se mantuvo la anestesia con pentobarbital sódico a una dosis de 25 mg/kg y se les aplico oxígeno a 40 mg/kg. Se incidieron a nivel de la vena yugular y se les realizo disección a nivel de la 2ª, 3ª y 4ª vértebras cervicales de las venas yugulares y carótidas de ambos lados. Las cabezas de los perros fueron perfundidas por vía carotídea a través de una cánula con solución salina fisiológica (SSF) con 1000 U/100 ml de heparina, se bloquearon previamente las venas yugulares y se incidieron las mismas para el sangrado; ya que el sangrado aminoro, se cambio la SSF por paraformaldehído frío al 4% en 0.1 molar de fosfato buffer salino, con un pH de 7.4, se observo hasta que el globo ocular estuvo rígido para proceder a la enucleación.

APENDICE 2

Se deshidratan los ojos en el histoquinete pasando por formol, alcohol al 70%, alcohol al 96% 3 pases, alcohol absoluto 2 pases, xilol 3 pases, parafina 2 pases. Se programa el histoquinete en la noche, ya que se lleva aproximadamente 1 hora por cada líquido.

APENDICE 3

Se realizaron los cortes a 5 micras, colocándolos en una laminilla no tratada, aplicándoles unas gotas de alcohol (para extender los cortes y no se peguen a la laminilla) posteriormente se colocaron en la cámara de agua tibia, se extrajeron los cortes con las laminillas tratadas, dejándolas secar, todas las laminillas se mantuvieron a una temperatura de 56°C por 4 horas para desparafinarse y se realizo la inmunohistoquímica.

APENDICE 4

La laminillas tienen que ser tratadas con silano para tener una buena fijación,

Técnica:

1. Lavar las laminillas con agua corriente, y dejarlas secar
2. Poner las laminillas en silano por 3 minutos
3. Lavar con agua destilada, 3 veces
4. Secar en la estufa a 56° C por 18 horas aproximadamente, según el número de laminillas a tratar
5. Colocar el corte para realizar la inmunohistoquímica

APENDICE 5

Procedimiento del método ABC

Primer día.

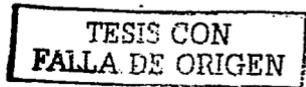
1. Desparafinar los cortes a 60°C toda la noche.
2. Desparafinar en 3 cambios de xilol de 5 min c/u.
3. Pasar por acetona 3 min. (para fijar bien el tejido).
4. Pasar por alcohol absoluto por 3 min. (hidratar)
5. Inhibir peroxidasa endógena con metanol y agua oxigenada por 30 min. (50ml de metanol+0.5ml de agua oxigenada al 3%).
6. Pasar a alcohol de 96% por 3 min.
7. Lavar con agua corriente.
8. Lavar con agua destilada.
9. Poner las laminillas en BFS, en 3 cambios de 3 min c/u.
10. Secar las laminillas alrededor del tejido y ponerlas en cámara húmeda para agregar SNCa e incubar a temperatura ambiente por 30 min.

11. Drenar el suero y limpiar alrededor del tejido para aplicar el anticuerpo primario correspondiente (caspa 3). Incubar en la camara humeda a 4°C por toda la noche.

Segundo día.

12. Enjuagar las laminillas con BFS, en 3 cambios de 3 min c/u.
13. Secar alrededor del tejido y aplicar anticuerpo secundario biotinilado (anticonejo) por 30 min a temperatura ambiente, en la cámara húmeda.
14. Enjuagar las laminillas con BFS, en 3 cambios de 3 min c/u.
15. Secar alrededor del tejido y aplicar complejo avidina-biotina por 30 min a temperatura ambiente en la cámara húmeda.
16. Enjuagar las laminillas con BFS, 3 cambios de 3 min c/u.
17. Revelar con DAB en cajitas de petri por n min observando la reacción al microscopio (es carcinógeno y se debe degradar con cloro 10ml por cada 100ml de solución).
18. Detener la reacción poniendo las laminillas en agua destilada.
19. Lavar con agua corriente.
20. Poner las laminillas en sulfato de cobre 10 min (para hacer más intensa la reacción).
21. Contrastar con hematoxilina de Mayers.
22. Lavar con agua corriente.
23. Diferenciar la hematoxilina con solución de scott 1 min.

Deshidratar, aclarar y montar con resina sintética.



XII. CUADROS

Cuadro 1

**PORCENTAJE DE CELULAS GANGLIONARES DE LA RETINA (CGR) TOTALES Y POSITIVAS
POR EL METODO DEL COMPLEJO AVIDINA-BIOTINA.**

# Laminilla	# de CGR	CGR positivas
1	106	17
2	24	8
3	26	6
4	64	9
5	54	8
6	50	10
7	72	12
8	97	14
9	35	6
10	20	5
Total	548	95

Total de CGR/# de laminillas= % de CGR totales

$$548/10=54.8\%$$

Total de CGR positivas/# de laminillas= % de CGR positivas

$$95/10=9.5\%$$

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

XIII. FIGURAS

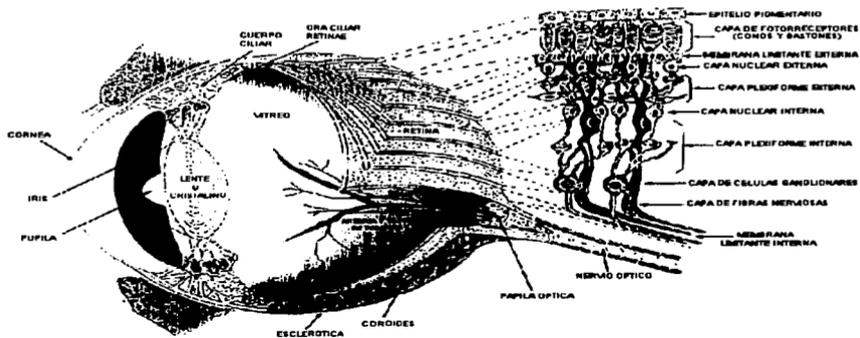


FIGURA 1. ANATOMIA E HISTOLOGIA DE LA RETINA

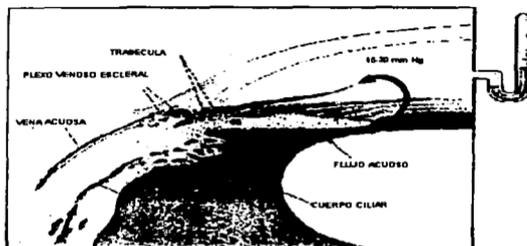


FIGURA 2. FLUJO NORMAL DEL HUMOR ACUOSO

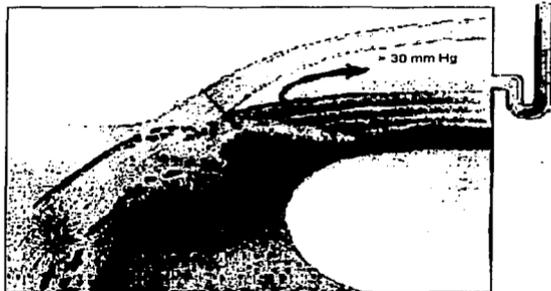


FIGURA 3. AUMENTO DE LA PRESION INTRAOCULAR (ANGULO CERRADO)

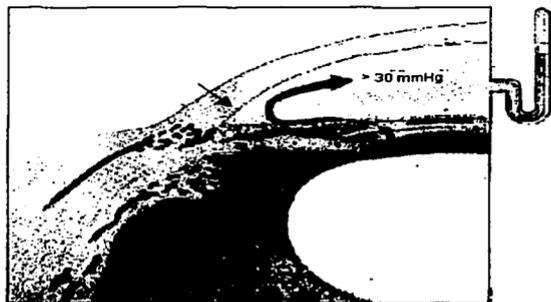
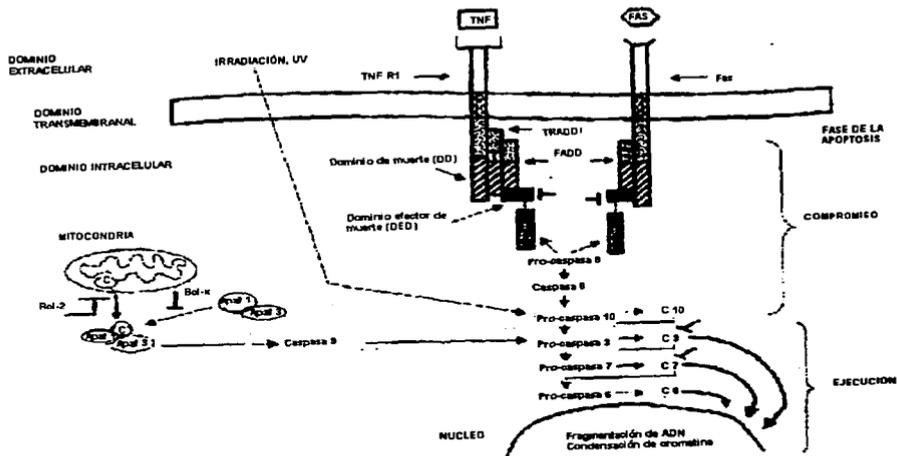


FIGURA 4. AUMENTO DE LA PRESION INTRAOCULAR (ANGULO ABIERTO)



VENTURA CALLEGOS JOSE LUIS

FIGURA 5. MECANISMOS DE APOPTOSIS

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



FIGURA 6. EVALUACIÓN DE LA PIO MEDIANTE TONOMETRÍA DIGITAL



**FIGURAS 7. GONIOLENTE
PUESTO EN OJO CANINO.**



**FIGURA 8. GONIOSCOPIA
SE OBSERVA EL ANGULO
IRIDOCORNEAL.**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



**FIGURA 9. EXCAVACIÓN DEL NERVIÓ OPTICO EN GLAUCOMA
VISTA CON EL OPTALMOSCOPIO INDIRECTO.**



**FIGURA 10. EXCAVACIÓN DEL NERVIÓ OPTICO EN GLAUCOMA
VISTA HISTOLOGICAMENTE**

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

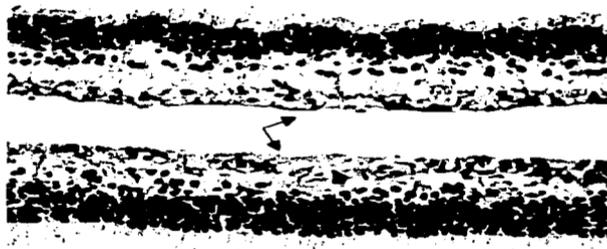


FIGURA 11. CASPASA 3 POSITIVA EN LA CAPA DE CELULAS GANGLIONARES DE LAS RETINAS (COLOR MARRON), METODO DEL COMPLEJO AVIDINA-BIOTINA (ABC).

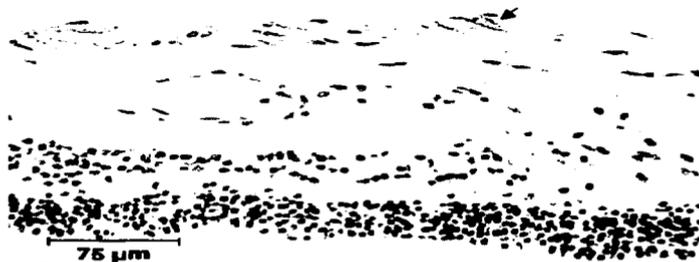


FIGURA 12. CASPASA 3 POSITIVA EN CELULAS GANGLIONARES DE LA RETINA METODO ABC.



FIGURA 13. CASPASA 3 POSITIVA EN CITOPLASMA DE CELULAS GANGLIONARES DE LA RETINA, METODO ABC.

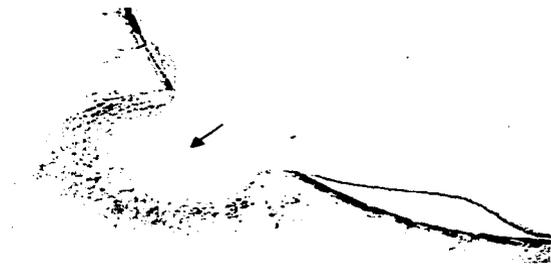


FIGURA 14. CASPASA 3 POSITIVA (COLOR MARRON) EN EL NERVIO OPTICO EXCAVADO DE PERRO CON GLAUCOMA PRIMARIO, METODO ABC.



FIGURA 15. APOPTOSIS EN CELULAS GANGLIONARES DE LA RETINA POR EL METODO TUNEL.



FIGURA 16. APOPTOSIS EN CAPA DE FOTORRECEPTORES POR EL METODO TUNEL.



FIGURA 17. APOPTOSIS EN CAPA PLEXIFORME INTERNA POR EL METODO TUNEL.

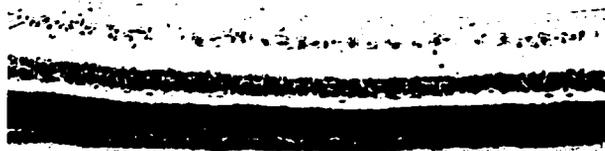


FIGURA 18. RETINA DE FERRO CON OJOS SANOS, CASPASA 3 NEGATIVA.



FIGURA 19. NERVIO OPTICO CASPASA 3 NEGATIVA.

TRONCO CON
FALLA DE ORIGEN