

Universidad Cardenal Herrera-CEU

Departamento de Medicina y Cirugía Animal



Caracterización funcional, estructural y
molecular del modelo de glaucoma crónico
experimental basado en la inyección
intracamerular de ácido hialurónico en la
rata

TESIS DOCTORAL

PRESENTADA POR:

Aloma Mayordomo Febrer

DIRIGIDA POR:

Dra. D^a. M^a. del Mar López Murcia

Dra. D^a. M^a. Dolores Pinazo Durán

Valencia, 2013

Universidad CEU Cardenal Herrera

Departamento de Medicina y Cirugía Animal



Caracterización funcional, estructural y
molecular del modelo de glaucoma crónico
experimental basado en la inyección
intracamerular de ácido hialurónico en la
rata

TESIS DOCTORAL

Aloma Mayordomo Febrer

Valencia
2013

A mis padres, Isabel y Fernando.

A Javi, por todo el tiempo que este trabajo nos ha robado.

Agradecimientos

Caracterización funcional, estructural y molecular del modelo de glaucoma crónico experimental basado en la inyección intracamerular de ácido hialurónico en la rata

Agradecimientos

Son tantas las personas que me han ayudado en este camino que es posible que me olvide de alguien, si es así pido disculpas de antemano.

Meri, ¿por dónde empezar?, gracias por todo. Por atenderme el primer día en tu despacho cuando te dije que quería hacer Oftalmología, por confiar en mí, aconsejarme y apoyarme. Por no perder la confianza en que esto acabaría saliendo, por contagiarme de optimismo y sobre todo por tu amistad y por ser todo un ejemplo para mí, te admiro.

A M^a Dolores Pinazo Durán por escucharme y querer ayudarme, por darme esta oportunidad sin ni siquiera conocerme, por tu genialidad y por tus ideas.

A Vicente Rodilla, per fer de l'estadística un món interessant i fins i tot per fer que l'entenga. Per la inesgotable paciència que has tingut al repetir i repetir mil vegades les coses i sobretot per fer-me riure quan més el necessitava.

A John Sapienza por acogerme siempre con tanto cariño, afianzar los pilares de mi amor por la Oftalmología y porque siempre me enseñas algo nuevo. Trabajar a tu lado es un placer y un privilegio que espero poder disfrutar durante mucho tiempo, lástima que estés tan lejos.

A toda la Unidad de Investigación Oftalmológica “Santiago Grisolía” del Hospital Universitario Dr. Peset y en especial a Sheila, Carla, Laura y Carmina por toda vuestra ayuda, paciencia y comprensión.

Al Laboratorio de Oftalmología Experimental del Departamento de Oftalmología, Optometría, Otorrinolaringología y Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina de Murcia y en especial a Marcelino porque sin conocerme me ofreciste toda tu amabilidad, tu paciencia y tus consejos.

Al servicio de metabólica de la Unidad Central de Investigación de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia y en especial a José Manuel, porque jamás pensé que entendería la metabólica y has hecho fácil lo difícil, por dedicarme “tanto del poco” tiempo que tienes y por sacar tanto de tan poco.

Al Laboratorio de Neurobiología del Sistema Visual del Departamento de Fisiología, Genética y Microbiología de la Universidad de Alicante y en especial a Nicolás Cuenca por el tiempo y trabajo que habéis dedicado a este trabajo.

Al Director General de Topcon Raúl Bellés, por facilitarnos el microscopio que ha permitido hacer toda la fase experimental.

Al Instituto de Ciencias Biomédicas de la Universidad CEU Cardenal Herrera y en especial a Juanma Corpa, por confiar en nosotras cuando nadie lo hizo y por “presionarnos” para alcanzar este objetivo.

Al Laboratorio del Departamento de Fisiología de la Universidad CEU Cardenal Herrera y en especial a María Miranda, Violeta y Sole por ayudarme siempre con una sonrisa, tratarme como una compañera más y por compartir nuestras penas “de investigación” durante los almuerzos entre pipetas de laboratorio. Mariola, Cris, muchas gracias por vuestros consejos, me han servido de mucho.

A Amor García, Filo y Rocío, por todo lo que me habéis enseñado, por la inmensa paciencia que habéis tenido al tallar los bloques buscando las retinas y los nervios ópticos que tanto nos han costado de encontrar y sobre todo, por hacerlo siempre sonriendo.

A todos mis compañeros de trabajo y en especial a Moni, Kati, Angelito, Empar, Juan, Rosana y Joaquín por vuestros ánimos, empuje y comprensión. Moni gracias de todo corazón por tus consejos y tu ayuda, sin ellos habría costado mucho más, estoy segura.

A Rafael Mazo y Joaquín Sopena por vuestros ánimos y apoyo.

Al animalario de la Unidad Central de Investigación de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia por ayudarme con mis “peques” siempre con una sonrisa. Pili, Ana y Eli, ha sido un placer trabajar con vosotras.

A mi amiga del alma Ana, por sentarte a mi lado el primer día de clase en Septiembre de 1998 y no separarte de mí jamás desde entonces; porque esta aventura comenzó cuando ya estaba a punto de tirar la toalla gracias a ti, por todo el tiempo que me has dedicado (sin tenerlo) y por todo lo que me has enseñado.

A María, la abuela Isabel, la abuela Encarna, “Coqui”, Nacho, Cristina y en especial a Josenet y Encarna por cuidarme como uno más de vuestra familia y darme todo vuestro cariño.

A mis padres, porque todo lo que soy os lo debo a vosotros y por la confianza que siempre me habéis demostrado.

A mi abuelo Joaquín, por el tiempo que me dedicaste aquellas tardes de despacho haciendo deberes y por ser todo un ejemplo. Te echamos de menos.

A Javi, por compartir conmigo un tercio de la vida, por ser el bastón en el que me apoyo cada día, por la paciencia que has tenido y que seguramente tendrás que tener.

Este trabajo ha sido financiado parcialmente por Ayudas a la investigación (AI/ICB- Santander 10/12) del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Universidad CEU Cardenal Herrera, la Red Temática de Investigación Colaborativa en Oftalmología (OfaRed) del Instituto de Salud Carlos III (Madrid), la Unidad de Investigación Oftalmológica “Santiago Grisolia” del Hospital Universitario Dr. Peset (Valencia) y el Departamento de Cirugía de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia.

Índices

Caracterización funcional, estructural y molecular del modelo de glaucoma crónico experimental basado en la inyección intracamerular de ácido hialurónico en la rata

Índice de contenidos

Introducción	1
Objetivos	7
Revisión Bibliográfica	11
<i>El sistema visual</i>	13
El globo ocular	14
Dinámica del humor acuoso	14
La retina	16
El nervio óptico	20
Vías visuales	21
<i>Glaucoma</i>	23
Diagnóstico de glaucoma	24

La presión intraocular	24
Examen del disco óptico	25
Examen del campo visual (perimetría)	25
Tipos de glaucoma	26
Glaucoma primario de ángulo abierto	26
Glaucoma de ángulo cerrado	29
Neuropatía óptica glaucomatosa	29
Teoría mecánica	30
Teoría vascular	30
Daño por reperfusión y estrés oxidativo	31
Excitotoxicidad mediada por el glutamato	32
Respuesta inmunitaria y papel de las células gliales	33
<i>Identificación, cuantificación y distribución de las CGR</i>	35
Identificación según criterios morfológicos	36
Identificación mediante la aplicación de trazadores neuronales	36
Identificación mediante marcadores neuronales específicos	37
Cuantificación de las células ganglionares de la retina	38
Distribución de las células ganglionares de la retina	39
Detección de apoptosis de las células ganglionares de la retina: TUNEL	40
<i>Evaluación electrodiagnóstica de la visión: electrorretinografía en la rata</i>	43
El flash ERG	44
Origen de las curvas del ERG	44
La onda a	45
La onda b	45
Los potenciales oscilatorios	45
Umbral de respuesta escotópica	46
Procedimiento	47
Preparación del paciente	47
Estimulación lumínica	47
Adquisición de la señal: filtros y electrodos	47
Interpretación de los resultados	48
Aplicaciones del ERG	49
ERG en glaucoma	49
<i>Metabólica: una visión general</i>	51
Resonancia magnética nuclear	52

Metabólica en enfermedades oculares	54
Metabólica del humor acuoso	55
<i>Modelos de glaucoma</i>	57
Medición de la presión intraocular	62
Tonometría de indentación	62
Tonometría de aplanamiento	62
Tonometría de rebote	64
Variables que afectan a la presión intraocular en la rata	64
Materiales y métodos	67
<i>Modelo animal</i>	69
<i>Diseño experimental</i>	71
Procedimientos realizados durante la fase de inducción del glaucoma crónico	72
Pesaje	72
Examen oftalmológico	73
Anestesia	74
Inyección de suero salino fisiológico y ácido hialurónico en la cámara anterior	75
Estudio electroretinográfico	76
Procedimientos realizados al finalizar la fase de inducción de glaucoma crónico	77
Estudio del perfil metabólico del humor acuoso	77
Estudio histopatológico de la retina y el nervio óptico	79
Estudio de la población de células ganglionares de la retina	82
Análisis estadístico	88
Estudio de la presión intraocular	88
Estudio electroretinográfico	88
Estudio del perfil metabólico del humor acuoso	88
Estudio histopatológico de la retina y el nervio óptico	89
Estudio de la población de células ganglionares de la retina	89
Resultados y discusión	91
<i>Modelo experimental</i>	93
<i>Hallazgos clínicos durante el modelo experimental de glaucoma crónico</i>	95
Evolución del peso	95
Hallazgos oftalmológicos e incidencias durante el modelo experimental	96
<i>Evolución temporal de la PIO durante el modelo experimental de glaucoma crónico</i>	103
<i>Valoración de los cambios electroretinográficos asociados al glaucoma crónico</i>	109

<i>Hallazgos en el perfil metabólico del humor acuoso tras la inducción del glaucoma</i>	119
Cambios en el perfil de lípidos	127
Cambios en el perfil de aminoácidos	128
Cambios en el perfil de hidratos de carbono	128
<i>Valoración histológica del daño retiniano asociado al glaucoma crónico</i>	131
<i>Estudio de la población de células ganglionares tras la inducción del glaucoma</i>	137
Cuantificación y distribución de las células ganglionares de la retina trazadas retrógradamente con Fluorogold	138
Marcaje neuronal de las células ganglionares de la retina con Brn3a	143
Detección de apoptosis mediante técnica TUNEL	146
Conclusiones	149
Futuras líneas de investigación	153
Resumen	157
Summary	163
Bibliografía	169

Índice de Tablas

Tabla 1. Ventajas y limitaciones de los distintos modelos animales de glaucoma (Weinreb y Lindsey, 2005).	58
Tabla 2. Valores basales de amplitud y latencia de la onda a y b (a altas y bajas intensidades de flash) y de los PO (a altas intensidades de flash).	110
Tabla 3. Regiones con diferencias estadísticamente significativas entre la muestra O8 OS y el resto de OS.	123
Tabla 4. Metabolitos que contribuyeron de manera significativa a la construcción del modelo discriminatorio.	124
Tabla 5. Metabolitos que no contribuyeron de manera significativa a la construcción del modelo discriminatorio.	127

Tabla 6. Espesor medio total y de las distintas capas de la retina en los dos ojos de las ratas del grupo glaucoma experimental.	133
Tabla 7. Espesor medio total y de cada una de las capas de las retinas del grupo control.	133
Tabla 8. Recuento de CGR-FG ⁺ de las retinas del grupo glaucoma experimental.	139
Tabla 9. CGR trazadas y marcadas con Brn3a al finalizar el modelo experimental.	144

Índice de Figuras

- Figura 1. Anatomía del globo ocular (Drake *et al.*, 2010). 14
- Figura 2. Organización laminar de la retina y de los principales elementos neuronales que la componen. A: esquema modificado de la retina (Hubel, 2000). B: corte sagital de una retina de rata adulta teñida con hematoxilina-eosina (40x) donde se observan las distintas capas histológicas. Epitelio pigmentario de la retina (EPR), segmento externo de los fotorreceptores (SEF), membrana limitante externa (MLE), capa nuclear externa (CNE), membrana plexiforme externa (MPE), capa nuclear interna (CNI), membrana plexiforme interna (MPI), capa de células ganglionares (CCG), capa de fibras del NO (CFN) y membrana limitante interna (MLI). 17
- Figura 3. Anatomía de la vía visual (Hubel, 2000). 21
- Figura 4. Parámetros y medidas de un ERG escotópico en la rata. La primera onda negativa tras el estímulo del flash (representado por una flecha roja) es la onda a, que viene seguida de una onda

positiva llamada onda b. Los PO están presentes en la parte ascendente de la onda b y su número puede variar dependiendo de la intensidad del estímulo. Cada onda se caracteriza por la amplitud (mV) y por su pico de latencia (ms). Figura modificada de Rosolen <i>et al.</i> (2005).	46
Figura 5. Espectro de ^1H correspondiente a muestras de HA de ojos de conejo donde se muestra la región alifática. Las abreviaturas pertenecen a los metabolitos identificados más representativos (Gribbestad y Midelfart, 1994).	53
Figura 6. Medición de la PIO con el Tono-Pen [®] Vet.	73
Figura 7. Máquina anestésica con cámara de inducción y máscara para roedores.	75
Figura 8. Inyección de AH en la cámara anterior del OS.	76
Figura 9. A: disposición de la rata y los electrodos tras la realización de un ERG. B: detalle del electrodo activo (1), el electrodo de referencia (2) y el estimulador de luz blanca LED acoplado al electrodo Koijman desconectado (3).	77
Figura 10. A: tubos de RMN de alta resolución de 1 mm de diámetro. B: espectrómetro Bruker Avance DRX 600 instalado en la Facultad de Medicina de Valencia (España).	78
Figura 11. A y B: mapa de isodensidad correspondiente al fotomontaje de una retina representativa derecha mostrando las CGR-FG ⁺ y las CGR-Brn3a ⁺ respectivamente. A cada una de las 64 ADI en las que se divide cada imagen individual se le asigna un color según el valor de la densidad de CGR, en una escala de colores de 28 pasos diferentes, con un rango de valores que va desde 0 (azul oscuro) a 3.500 o más CGR/mm ² (rojo).	87
Figura 12. Evolución del peso medio de las ratas durante las 10 semanas del procedimiento experimental.	96
Figura 13. Aspecto normal de los órganos anejos en la semana 5 del experimento.	97
Figura 14. Hallazgos oftalmológicos en el OD y el OS a lo largo del modelo experimental.	97
Figura 15. A: midriasis leve en el OD de una rata en la semana 6 del experimento. B: miosis pupilar observada en un animal diferente en la misma semana del experimento.	98
Figura 16. Sinequia anterior dorsal presente en el OS en la semana 3 del experimento.	99
Figura 17. Hernia de iris ventral con desplazamiento ventral de la pupila en la semana 5 del experimento.	99
Figura 18. Edema de córnea dorsal en el OD en la semana 5 del experimento.	100

- Figura 19. Catarata capsular anterior y hernia de iris dorsal lateral en el OS en la semana 7 del experimento. 101
- Figura 20. Valores de PIO, tomados con el Tono-Pen® Vet para el OD y el OS cada semana del experimento. Los datos se expresan como media \pm DE (* $p < 0,05$). 104
- Figura 21. Valores de PIO, tomados con el Tono-Pen® Vet para el OD y el OS en la semana 7 del experimento y 24 horas después. Los datos se expresan como media \pm DE (* $p < 0,05$). 107
- Figura 22. Valores de PIO, tomados con el Tono-Pen® Vet para el OD y el OS en la semana 0, 5, 7, 8, 9 y 10 del experimento y 48 horas después. Los datos son expresan como media \pm DE (* $p < 0,05$). 108
- Figura 23. ERG escotópico a bajas y altas intensidades de flash en el OD (A) y el OS (B) al comienzo del experimento (N: momento del inicio del flash, a: onda a, b: onda b). C y D: PO del OD y el OS respectivamente (N2: momento del inicio del flash, P2: sumatorio de latencias de los PO). 111
- Figura 24. Amplitud de la onda b del OD y el OS, a altas intensidades de flash, a lo largo del experimento. Los datos se expresan como media \pm DE (n=15), ** $p < 0,02$. 112
- Figura 25. ERG escotópico, a bajas y altas intensidades de flash, en el OD (A) y el OS (B) tras cinco semanas del comienzo del experimento (N: momento del inicio del flash, a: onda a, b: onda b). C y D: PO del OD y el OS respectivamente (N2: momento del inicio del flash, P2: sumatorio de latencias de los PO). 112
- Figura 26. Evolución temporal de la amplitud de la onda b en el OS a bajas intensidades de flash. Los datos se expresan como media \pm DE (n=15), ** $p < 0,02$. 113
- Figura 27: Evolución temporal de la amplitud de la onda b a altas intensidades de flash para el OD. Los datos se expresan como media \pm DE (n=15), *** $p < 0,001$. 113
- Figura 28. Evolución temporal de la latencia de la onda b del OS. Los datos se expresan como media \pm DE (n=15), *** $p < 0,001$. 114
- Figura 29: Evolución temporal de la latencia de la onda a del OD. Los datos se expresan como media \pm DE (n=15), *** $p < 0,001$. 114
- Figura 30. Evolución temporal de la latencia de la onda b del OD. Los datos se expresan como media \pm DE (n=15), * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$. 115
- Figura 31. Comparación entre el sumatorio de la amplitud de los PO del OD y el OS a lo largo del experimento. Los datos se expresan como media \pm DE (n=15), * $p < 0,05$, ** $p < 0,02$. 115

- Figura 32. Evolución temporal del sumatorio de la amplitud de los PO en el OS (A) y en el OD (B). Los datos se expresan como media \pm DE (n=15), **p<0,02, ***p<0,001. 116
- Figura 33. Evolución temporal de la latencia del sumatorio de los PO en el OS (A) y en el OD (B). Los datos se expresan como media \pm DE (n=15), **p<0,02, ***p<0,001. 117
- Figura 34. Espectro representativo del HA procedente del OD y el OS en el que se muestra la zona aromática y alifática. 120
- Figura 35. Comparación entre el perfil metabolómico del HA del OD y el OS y asignación de diferentes metabolitos de la zona alifática. 121
- Figura 36. PCA donde se señala la posición del *outlayer* 08 OS. En rojo se exponen las muestras correspondientes al OS y en azul al OD. 123
- Figura 37. Diagrama de puntuaciones del PLS-DA (parte alifática) maximizado. En rojo se exponen las muestras correspondientes al OS y en azul al OD. 124
- Figura 38. Metabolitos, ordenados alfabéticamente, que contribuyeron de manera significativa a la construcción del modelo discriminatorio. *p<0,05, **p<0,02, ***p<0,001. 125
- Figura 39. Metabolitos, ordenados alfabéticamente, que contribuyeron de manera significativa a la construcción del modelo discriminatorio. *p<0,05 **p<0,02. 126
- Figura 40. Sección transversal de una retina, teñida con hematoxilina eosina, perteneciente a una rata en la que un ojo ha sido inyectado con SSF (A) y el otro con AH (B) durante 10 semanas. 132
- Figura 41. Sección transversal, teñida con hematoxilina eosina, del NO del ojo control con patrón de tinción homogénea (A) y del ojo glaucoma (B). 134
- Figura 42. Distribución de la totalidad de la población de CGR-FG⁺. Fotomontaje de una retina derecha representativa del grupo glaucoma experimental (A) y una retina izquierda del grupo control (C) mostrando las CGR marcadas con FG. La zona con más alta densidad se distribuye a lo largo de una estría nasotemporal en la retina dorsal. Mapa de isodensidad (B y D) correspondiente a los fotomontajes de las dos retinas. En todas las retinas el polo dorsal está orientado a las 12 horas. 140
- Figura 43. Ausencia casi completa de CGR-FG⁺ en dos OS del grupo glaucoma experimental. A y C: fotomontaje de dos retinas izquierdas que muestran la ausencia casi total de CGR-FG⁺ y sus correspondientes mapas de isodensidad (B y D). En las zonas de menor densidad celular los colores son más fríos que en las retinas control. 141

Figura 44. Distribución de las CGR trazadas con FG donde se muestra el patrón de pérdida de CGR-FG⁺ localizado (A y B) y difuso (C y D). A y C: fotomontaje de las dos retinas izquierdas y sus correspondientes mapas de isodensidad (B y D). 142

Figura 45. CGR inmunodetectadas mediante Brn3a en el OD y el OS. Los histogramas muestran la media \pm DE. * $p < 0,05$. 143

Figura 46. CGR trazadas con FG y marcadas con Brn3a al finalizar el modelo experimental. Los histogramas muestran la media \pm DS. 144

Figura 47. Comparación entre los mapas de isodensidad para las CGR-FG⁺ (A y C) y las CGR-Brn3a⁺ (B y D) de una retina representativa del OD (A y B) y del OS (C y D). 145

Símbolos y abreviaturas

Caracterización funcional, estructural y molecular del modelo de glaucoma crónico experimental basado en la inyección intracamerular de ácido hialurónico en la rata

Listado de símbolos y abreviaturas

- μl : Microlitro.
- μm : Micra.
- μm^2 : Micra².
- μV : Microvoltio.
- 08 OS: Ojo izquierdo de la rata 8.
- 2D: 2 dimensiones.
- ¹³C: Isótopo de Carbono.
- ¹H: Isótopo de Hidrógeno.
- ¹⁵N: Isótopo de Nitrógeno.
- ³¹P: Isótopo de Fósforo.
- AA: Ácido ascórbico.
- ADI: Áreas de interés.

- AH: Ácido hialurónico.
- CCG: Capa de células ganglionares.
- cd.s/m^2 : Candela por segundo por metro².
- CFN: Capa de fibras del nervio óptico.
- CGR: Células ganglionares de la retina.
- CGR-Brn3a⁺: CGR marcadas con Brn3a.
- CGR-FG⁺: CGR trazadas retrógradamente con Fluorogold.
- Ca⁺²: Calcio.
- Cl⁻: Cloro.
- cm: Centímetro.
- CNE: Capa nuclear externa.
- CNI: Capa nuclear interna.
- CO₂: Dióxido de carbono.
- CS: Colículo superior.
- D₂O: Óxido de deuterio.
- DE: Desviación estándar.
- EM: Espectrometría de masa.
- EPR: Epitelio pigmentario de la retina.
- ERG: Electrorretinograma.
- FG: Fluorogold.
- FSO: Flujo sanguíneo ocular.
- GABA: Ácido gamma-aminobutírico.
- GAC: Glaucoma de ángulo cerrado.
- GAG: Glucosaminoglicanos.
- g: Gramos.
- g/l: Gramos por litro.
- GPAA: Glaucoma primario de ángulo abierto.
- GPAC: Glaucoma primario de ángulo cerrado.
- HA: Humor acuoso.
- HCO₃⁻: Bicarbonato.
- HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia.
- Hz: Hercio.
- kg: Kilogramos.
- kOhms: Kilo ohmios.
- M: Molar.

- mg: Miligramos.
- MHz: Megahercios.
- ml: Mililitros.
- MLE: Membrana limitante externa.
- MLI: Membrana limitante interna.
- mm Hg: Milímetros de mercurio.
- mm: Milímetros.
- mM: Milimolar.
- mm²: Milímetros ².
- MPE: Membrana plexiforme externa.
- MPI: Membrana plexiforme interna.
- ms: Milisegundos.
- NGL: Núcleo geniculado lateral.
- NO: Nervio óptico.
- NOG: Neuropatía óptica glaucomatosa.
- Núcleo-DAPI[†]: Núcleo teñido con tinción DAPI.
- OCT: Tomografía de coherencia óptica.
- OD: Ojo derecho.
- OftaRed: Red Temática de Investigación Colaborativa en Oftalmología.
- ON: Óxido nítrico.
- ONS: Óxido nítrico sintasa.
- ONSi: Óxido nítrico sintasa inducible.
- OS: Ojo izquierdo.
- PB: Tampón fosfato.
- PBS: Tampón fosfato salino.
- PCA: Análisis de componentes principales.
- PERG: *Pattern* ERG.
- PIO: Presión intraocular.
- PLS-DA: Análisis discriminativo por mínimos cuadrados parciales.
- PO: Potenciales oscilatorios.
- ppm: Partes por millón.
- PVE: Potenciales visuales evocados.
- RCD: Ratio copa óptica-disco óptico.
- RMN: Resonancia magnética nuclear.
- ROS: Especies reactivas de oxígeno.

- SD: Rata albina *Sprague-Dawley*.
- SEF: Segmento externo de los fotorreceptores.
- SIF: Segmento interno de los fotorreceptores.
- SNC: Sistema nervioso central.
- STR: Umbral de respuesta escotópica.
- TNF- α : Factor de necrosis tumoral α .
- TUNEL: *Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated d-UTP-biotin nick end labeling*.
- UCIM: Unidad Central de Investigación.
- V1: Área visual primaria.
- VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad.

Introducción

Caracterización funcional, estructural y molecular del modelo de glaucoma crónico experimental basado en la inyección intracamerular de ácido hialurónico en la rata

Introducción

El glaucoma es una enfermedad degenerativa y progresiva que se caracteriza por la pérdida irreversible de células ganglionares de la retina, atrofia del nervio óptico y la consecuente pérdida de visión (Distelhorst y Hughes, 2003, Adatia y Damji, 2005, Morrison *et al.*, 2008). Constituye la segunda causa de ceguera mundial (Quigley y Broman, 2006, Ray y Mookherjee, 2009) y se trata por tanto de una patología con gran impacto social en términos de morbilidad, pérdidas en la productividad y costes de salud (Infeld y O'Shea, 1998).

Aunque existen distintos tipos de glaucoma, el de ángulo abierto constituye la forma más frecuente en la especie humana, representando el 90% de la casuística, y se produce por alteraciones en el sistema de drenaje del humor acuoso (Adatia y Damji, 2005). El factor de riesgo más importante (aunque no el único) en la incidencia, severidad y progresión de esta patología es el aumento de la presión intraocular (Bui *et al.*, 2005, Buys *et al.*, 2012, Gugleta *et al.*, 2012).

Los estudios realizados en modelos animales de glaucoma han servido para entender los mecanismos de formación y eliminación del humor acuoso y el mantenimiento de la presión intraocular, y se constituyen como una herramienta muy útil para el estudio de la etiología del glaucoma así como para el desarrollo de tratamientos. Los modelos basados en roedores, y en particular en la rata, aportan avances en el entendimiento sobre la fisiopatología de esta enfermedad gracias a que son fáciles de manipular experimentalmente, tienen un corto periodo de vida y un coste reducido y la estructura y funcionalidad ocular son similares a la especie humana (Cohan y Bohr, 2001, Johnson y Tomarev, 2010, Samsel *et al.*, 2011).

La mayoría de procedimientos experimentales desarrollados en los modelos de glaucoma incrementan mediante distintos mecanismos la presión intraocular hasta originar el deterioro de las células ganglionares de la retina, sin producir daños en el resto de estructuras intraoculares (Stewart *et al.*, 2000, Levkovitch-Verbin *et al.*, 2002, Johnson y Tomarev, 2010). Se han descrito varios modelos en la rata; entre ellos, Moreno *et al.* (2005) obtuvieron una hipertensión de larga duración mediante la inyección semanal de ácido hialurónico en la cámara anterior durante 10 semanas. Estos investigadores demostraron cambios tanto funcionales como histológicos en la retina. El modelo es económico, fácil de realizar, y permite, según los autores, obtener una hipertensión consistente y elevada de larga duración, pero sin impedir la eliminación del humor acuoso.

Para caracterizar correctamente un modelo de glaucoma es fundamental poner de manifiesto la pérdida de células ganglionares de la retina. La histopatología se ha utilizado tradicionalmente para observar la disminución de estas células y diferenciarlas del resto de componentes celulares y evidenciar los cambios en las distintas capas de la retina. En la rata, la capa de células ganglionares alberga también una pequeña población de células amacrinas y horizontales desplazadas (Perry, 1981, Perry *et al.*, 1983, Silveira *et al.*, 1989) que hace que los criterios anatómicos basados en el tamaño del soma neuronal tengan una menor precisión y se utilicen menos en la actualidad. Por ello, se han desarrollado técnicas que detectan con mayor especificidad las células ganglionares de la retina, como son la aplicación de trazadores neuronales retrógrados o marcadores moleculares específicos que utilizan la inmunodetección de proteínas (Vidal-Sanz *et al.*, 2012).

Es bien sabido que el glaucoma produce modificaciones de la actividad eléctrica de la retina, que se traducen en cambios del voltaje y de la amplitud de las distintas ondas, así como de los potenciales oscilatorios (Bayer *et al.*, 2001b, Bayer *et al.*, 2001c). Por ello, la electroretinografía es un método diagnóstico muy utilizado en los modelos de glaucoma, que cuenta además con la ventaja de ser poco invasivo y fácil de realizar en roedores.

Por otra parte, la apoptosis juega un papel fundamental en la degeneración de las células ganglionares en ojos glaucomatosos, aunque los mecanismos celulares y moleculares exactos no son del todo conocidos (Grus y Sun, 2008). Existen varios métodos para detectar apoptosis en tejidos *in vitro*; uno de los más utilizados es la técnica TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated d-UTP-biotin nick end labeling*), descrita por Gavrieli *et al.* (1992).

La metabolómica es una disciplina científica en auge de gran utilidad que permite identificar y cuantificar la concentración de los metabolitos presentes en tejidos o fluidos orgánicos, utilizando técnicas de espectroscopia avanzadas, como la espectrometría de masa o la resonancia magnética nuclear (Midelfart, 2009). En la última década se han realizado varios estudios a nivel ocular, que han aportado información sobre los mecanismos patogénicos implicados en distintas enfermedades oftalmológicas (Young y Wallace, 2009, Jovanovic *et al.*, 2010). Aunque, en nuestro conocimiento, no se han realizado estudios de metabolómica mediante resonancia magnética nuclear con muestras de humor acuoso en pacientes con glaucoma, esta herramienta puede resultar muy útil para caracterizar los cambios que tienen lugar en esta enfermedad.

Objetivos

Caracterización funcional, estructural y molecular del modelo de glaucoma crónico experimental basado en la inyección intracamerular de ácido hialurónico en la rata

Objetivos

Los objetivos que han de guiar el desarrollo de nuestro estudio son los siguientes:

- **Objetivo general**

Caracterizar el modelo de glaucoma crónico en la rata basado en la inyección semanal de ácido hialurónico en la cámara anterior durante 10 semanas.

- **Objetivos específicos**

Como objetivos específicos se plantea estudiar los efectos del glaucoma reproducido experimentalmente a varios niveles:

- Estudiar la evolución de la presión intraocular y las manifestaciones oculares derivadas de la técnica experimental.
- Demostrar cambios en la actividad electroretinográfica en condiciones escotópicas.

- Analizar el número de células ganglionares de la retina, el espesor completo y de cada una de las capas de la retina, así como el área de sección del nervio óptico mediante microscopía óptica.
- Cuantificar y estudiar la distribución de la población total de células ganglionares de la retina. Para ello se combinarán varios procedimientos: la detección de apoptosis mediante la técnica TUNEL, la aplicación de un trazador neuronal (Fluorogold®) y la inmunodetección mediante un marcador molecular específico (Brn3a).
- Identificar el perfil metabolómico del humor acuoso mediante espectroscopia por resonancia magnética nuclear.
- Integrar los resultados obtenidos para evaluar la viabilidad del modelo de glaucoma crónico.

Revisión Bibliográfica

Caracterización funcional, estructural y molecular del modelo de glaucoma crónico experimental basado en la inyección intracamerular de ácido hialurónico en la rata

El sistema visual

El sistema visual está compuesto por una serie de estructuras conectadas entre sí que permiten recibir, relacionar y procesar los estímulos luminosos para transformarlos en la percepción visual del mundo que nos rodea. Estas estructuras son: el globo ocular, el nervio óptico (NO) y la vía óptica, esta última formada principalmente por el quiasma óptico, los tractos ópticos y las diferentes zonas de proyección visual subcortical y cortical.

Este esquema es muy similar en la mayoría de mamíferos salvo ligeras variaciones por lo que en primer lugar haremos referencia al ser humano y posteriormente añadiremos algunas anotaciones sobre la rata, animal escogido para el desarrollo de los experimentos.

El globo ocular

El ojo es una estructura esférica formada por tres capas (Figura 1). La túnica fibrosa o externa es muy dura (para proteger las estructuras internas) y da forma al globo ocular. Está compuesta por la córnea (parte anterior y transparente) y la esclera (parte posterior y opaca). La túnica vascular o úvea está altamente pigmentada y vascularizada y en ella se distingue una parte anterior formada por el iris y el cuerpo ciliar y una parte posterior formada por la coroides. En el cuerpo ciliar se encuentran los procesos ciliares responsables de la producción del humor acuoso (HA) y el músculo ciliar, del cual salen las fibras zonulares que suspenden el cristalino. Por detrás de la lente se encuentra el cuerpo vítreo que es una sustancia gelatinosa y transparente que rellena la parte posterior del globo ocular dando soporte a la retina. Por último la túnica nerviosa o retina es la capa más interna y en ella se inicia la percepción visual (Samuelson, 2007).

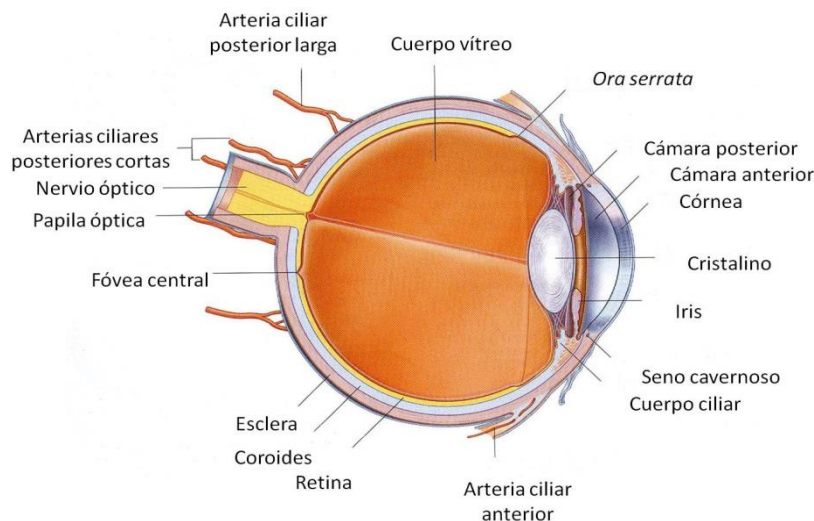


Figura 1. Anatomía del globo ocular (Drake et al., 2010).

Topográficamente, el globo ocular se divide en dos segmentos: el anterior (desde la córnea hasta el cristalino) y el posterior (desde el cristalino hasta la retina). A su vez el segmento anterior se subdivide en dos cámaras: anterior y posterior (Figura 1).

Dinámica del humor acuoso

El HA es un fluido transparente que se forma en el epitelio no pigmentado de los procesos ciliares del cuerpo ciliar. Se secreta a la cámara posterior y circula hacia la cámara anterior atravesando la pupila y bañando al cristalino. Una gran proporción de HA se elimina a través del

ángulo iridocorneal (vía convencional): alcanza la malla trabecular, atraviesa la cara interna del canal de Schlemm hacia su luz y sale por los canales colectores de drenaje: las venas episclerales. El resto se elimina a través de la vía de drenaje uveoescleral o no convencional en la que el HA atraviesa el espacio intersticial del músculo ciliar hacia el tejido supracoroideo y la esclera (Distelhorst y Hughes, 2003, Goel *et al.*, 2010).

La tasa de producción de HA varía a lo largo del día, con un pico máximo durante las horas de vigilia y un nadir a primera hora de la mañana. En las personas, se secreta entre 1 y 3 μ l de fluido cada minuto a la cámara posterior, cuyo volumen es de 0,06 ml, desde donde la mayoría fluye a la anterior, que tiene un volumen de 0,25 ml (Macknight *et al.*, 2000). En ratas el volumen aproximado de la cámara anterior es de 15 μ l (Mermoud *et al.*, 1996).

La malla trabecular, presente en el ángulo iridocorneal, desempeña un papel muy importante en la salida del HA y por tanto en la regulación de la presión intraocular (PIO) pues funciona como un filtro de limpieza (Benozzi *et al.*, 2002). Está compuesta por una serie de haces que contienen matrices de material extracelular entre cuyos componentes se ha detectado glucosaminoglicanos (GAG) como el ácido hialurónico (AH) en el conejo, el humano y el mono (Acott *et al.*, 1985) y proteínas como la fibronectina o la laminina. Revistiendo los haces se encuentran células que también están implicadas en la regulación de la salida del HA (Sato y Roy, 2002).

La circulación del HA hacia el segmento anterior cumple numerosas funciones (Goel *et al.*, 2010):

- Aporta oxígeno y nutrientes a las estructuras del segmento anterior como la córnea, el cristalino y la malla trabecular y elimina metabolitos.
- Mantiene la PIO necesaria para garantizar el tono y la forma adecuada del globo ocular.
- Participa en la respuesta inmune local durante la inflamación e infección, permitiendo la circulación de mediadores inflamatorios y de fármacos a través de las distintas estructuras.

Los principales componentes del HA son iones orgánicos e inorgánicos, carbohidratos, antioxidantes como el glutatión o el ácido ascórbico (AA), urea, aminoácidos y proteínas, oxígeno, dióxido de carbono, lactato y agua (Tkadlecova *et al.*, 1999, Goel *et al.*, 2010). El HA procede del plasma sanguíneo aunque su composición química es distinta, siendo la concentración de proteínas y de AA los principales elementos diferenciadores. La concentración de proteínas en el HA oscila entre 0,05-0,15 g/l mientras que en el plasma sanguíneo el rango varía entre 60-70 g/l. Aunque el HA tiene una baja concentración de proteínas (esencial para mantener la transparencia

que permite la visión), todas las proteínas plasmáticas están presentes en él (To *et al.*, 2002). Determinadas inmunoglobulinas, como las IgG, están presentes en mayor concentración comparadas con las IgM o las IgA. Los niveles de AA en el HA de las personas y la mayoría de animales (sobre todo los diurnos) se encuentran en una concentración muy superior a la del plasma (Reiss *et al.*, 1986, Rose y Bode, 1991) pues protege las estructuras intraoculares del daño foto-oxidativo (Ringvold *et al.*, 2000).

Asimismo la concentración de algunos iones, como por ejemplo el Cl^- y el HCO_3^- , difiere significativamente del plasma sanguíneo, existiendo variaciones entre las distintas especies que se ven reflejadas en el pH del HA (To *et al.*, 2002).

Por otro lado, los niveles de lactato en el HA se encuentran en una concentración mucho mayor a la del plasma debido, según estudios previos, al metabolismo de la glucosa a nivel de la córnea, la lente, el cuerpo ciliar y la retina que hace que la mayor parte del producto final de esta conversión se libere rápidamente por difusión al HA (Riley, 1972).

La secreción del HA y la regulación de su flujo son procesos importantes para el correcto funcionamiento del globo ocular. Producción y eliminación están en equilibrio constante, de tal manera que cuando se altera la eliminación se produce un aumento de la PIO, que es el principal factor de riesgo en la patogénesis y progresión del glaucoma aunque no el único (Stewart *et al.*, 2000, Goel *et al.*, 2010).

La retina

La retina es una fina y delicada membrana derivada del neuroectodermo embrionario que cubre la superficie interna de la parte posterior del globo ocular hasta 5 mm por delante del ecuador. Se extiende desde la cabeza del NO hasta la *ora serrata* donde se continua con el epitelio no pigmentado de la *pars plana* del cuerpo ciliar. Contacta íntimamente con la coroides en su parte más externa y con el cuerpo vítreo en su parte interna. Es una extensión del sistema nervioso central (SNC) que está especializada en transformar la energía lumínica que viaja a través de las estructuras transparentes del ojo en impulsos eléctricos que son conducidos a través de los axones del NO hasta la corteza cerebral, donde tiene lugar el procesamiento de la visión (Hubel, 2000, Samuelson, 2007).

En el centro de la retina se sitúa una estructura denominada mácula que es la responsable de la visión central y en color. Mide unos 5,5 mm y en su centro se encuentra la fovea, una depresión pequeña que contiene la mayor densidad de conos de toda la retina (15.000/mm²) y que carece

de bastones. Más allá de esta zona, la retina se encarga de la visión periférica y con poca iluminación, gracias a los bastones (Hubel, 2000).

La circulación retiniana procede de la arteria central de la retina (rama de la arteria oftálmica) y se caracteriza por tener un bajo flujo, una elevada extracción de oxígeno y la presencia de unas uniones endoteliales estrechas que dan lugar a la barrera hemato-retiniana, que es similar a la hemato-encefálica. La circulación coroidea es importante para el aporte de nutrientes a la retina, así como para el mantenimiento de la temperatura y del volumen del globo ocular; procede de la arteria ciliar posterior (rama de la arteria oftálmica), supone el 85% del aporte sanguíneo total del globo ocular y se caracteriza por un flujo elevado y una baja extracción de oxígeno (Flammer *et al.*, 2002).

Desde un punto de vista histológico la retina se divide en 10 capas (Figura 2); 9 de ellas forman la retina neurosensorial y la décima es el epitelio pigmentario de la retina (EPR).

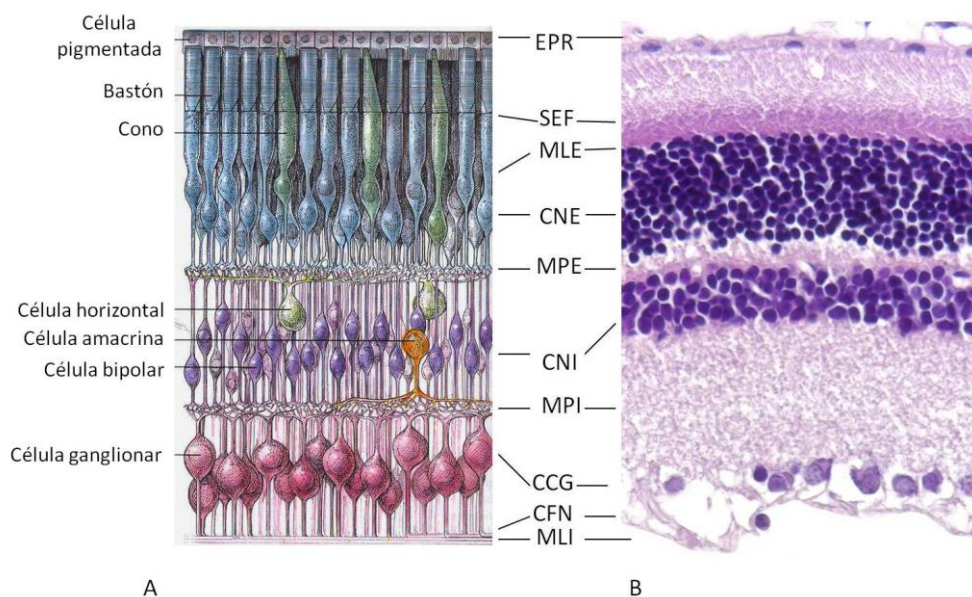


Figura 2. Organización laminar de la retina y de los principales elementos neuronales que la componen. A: esquema modificado de la retina (Hubel, 2000). B: corte sagital de una retina de rata adulta teñida con hematoxilina-eosina (40x) donde se observan las distintas capas histológicas. Epitelio pigmentario de la retina (EPR), segmento externo de los fotorreceptores (SEF), membrana limitante externa (MLE), capa nuclear externa (CNE), membrana plexiforme externa (MPE), capa nuclear interna (CNI), membrana plexiforme interna (MPI), capa de células ganglionares (CCG), capa de fibras del NO (CFN) y membrana limitante interna (MLI).

Desde un punto de vista morfológico, la retina es un tejido altamente organizado en el que se diferencian seis tipos principales de neuronas (Figura 2). Éstas se estructuran anatómicamente en tres capas donde se sitúan sus cuerpos nucleares: la capa nuclear externa (CNE), la capa nuclear

interna (CNI) y la capa de células ganglionares (CCG) y dos membranas sinápticas: la membrana plexiforme externa (MPE) y la membrana plexiforme interna (MPI), en las que se sitúan los axones y las dendritas y por tanto donde acontecen la mayor parte de las sinapsis (Dowling, 1987, Hubel, 2000).

Otros tipos celulares componen el tejido de soporte neuronal: la macroglía (células de Müller, astrocitos y oligodendrocitos) y la microglía (Samuelson, 2007).

En sus dos extremos la retina se delimita por la membrana limitante externa (MLE) y la membrana limitante interna (MLI). La externa está constituida por una región de zónulas adherentes que unen firmemente los segmentos internos de los conos y los bastones a las células de Müller y también las células de Müller entre sí. La interna es una membrana basal formada por la unión de las terminaciones de las células de Müller y separa el vítreo de la retina neurosensorial (Samuelson, 2007).

Capa nuclear externa

Contiene los fotorreceptores (conos y bastones), que son las células encargadas de la absorción de la luz y de su transformación en impulsos nerviosos. Anatómicamente se puede apreciar las distintas partes que los constituyen, que del exterior al interior del ojo se subdividen en: el segmento externo (SEF), localizado entre el EPR y la MLE, donde están los fotorreceptores de conos y bastones, y el segmento interno, donde se encuentran el núcleo y las organelas. Los conos son responsables de la visión diurna y en color, proporcionando una mayor agudeza visual y resolución que los bastones, que se encargan de la visión en condiciones de baja luminosidad (Curcio *et al.*, 1990).

El EPR es la capa más externa de la retina. Consiste en una monocapa de células poligonales cuya función es apoyar y mantener a los fotorreceptores subyacentes mediante cinco procesos principales: absorbe la luz dispersa que entra en el polo posterior, participa en el transporte activo de metabolitos, proporciona la barrera hemato-retiniana, regenera los pigmentos visuales y realiza la fagocitosis (Quinn y Miller, 1992).

Capa nuclear interna

En esta capa se sitúan los somas de las células bipolares, horizontales, interplexiformes y amacrinas. Las células bipolares reciben la información de los fotorreceptores y la envían a las

CGR; las células horizontales conectan los fotorreceptores y las bipolares mediante uniones largas y paralelas que se distribuyen por toda la retina y de forma similar, las células amacrinas unen las CGR con las células bipolares (Salinas-Navarro, 2011).

Capa de células ganglionares

Es la capa más interna, y contiene principalmente los cuerpos de las CGR y las células amacrinas desplazadas, aunque también se encuentran los astrocitos retinianos.

Las CGR están encargadas de recoger la información de las capas y membranas retinianas previas, la conducen hacia el NO y a través de él a las zonas de proyección visual subcortical. Están especializadas en la captación de contrastes o los cambios rápidos de iluminación además de contribuir a procesar aspectos de la imagen, como la forma o el movimiento que se completarán posteriormente en la corteza visual.

Desde que en 1899 Ramón y Cajal describiera su morfología en su “Textura del sistema nervioso del hombre y los vertebrados”, en roedores se han descrito multitud de clasificaciones basadas en el tamaño de su soma y la morfología de sus dendritas (Fukuda, 1977, Perry, 1979, Dreher *et al.*, 1985).

En la práctica muchas de estas clasificaciones resultan complicadas y no tienen relevancia para el propósito del estudio por lo que hoy en día se siguen empleando las más sencillas como las de Fukuda (1977) o Perry (1979).

Fukuda (1977) las clasificó en tres grandes grupos según el tamaño del soma: las CGR grandes tienen diámetros mayores a 14,5 μm , se distribuyen de forma regular por toda la retina y suponen el 5% del total de las CGR. Las medianas tienen diámetros entre 11,5 y 14,5 μm , se encuentran en la zona central de la retina y representan aproximadamente un 30% del total de las CGR. Las pequeñas tienen un diámetro entre 6 y 11,5 μm , se distribuyen regularmente por toda la retina y constituyen aproximadamente el 65% de la población de las CGR.

Posteriormente, Perry (1979) dividió las GCR en tres tipos: I, II y III basándose en criterios morfológicos y ayudándose de la tinción de Golgi. El inconveniente de esta técnica fue que no se pudieron identificar las células de forma inequívoca porque no siempre se visualizaban los axones.

Las células amacrinas desplazadas se caracterizan por la ausencia de axones y aunque su función no se conoce del todo, probablemente estén relacionadas con la integración de la información. En la rata suponen aproximadamente el 50% de la población neuronal de la CCG (Perry, 1981, Perry *et al.*, 1983, Silveira *et al.*, 1989).

Neuroglía retiniana

Uno de los elementos celulares más importantes de la retina y que en los últimos años ha tenido más adeptos entre los investigadores es la neuroglía, que está compuesta por la macroglía (células de Müller, astrocitos y oligodendrocitos) y la microglía.

Las células de Müller se localizan de forma radial a lo largo de la retina, atravesando todas las capas. Sus somas se asientan en la CNI, desde la que proyectan unos procesos irregulares en ambos sentidos que se prolongan hasta la MLE y la MLI. Las funciones más importantes de las células de Müller son: proveer de glucosa a las neuronas a partir de reacciones metabólicas anaeróbicas del glucógeno almacenado, retirar los productos de desecho metabólico (CO₂, amonio), reciclar los aminoácidos de los neurotransmisores liberados durante la sinapsis, controlar la homeostasis y proteger a las neuronas de cambios deletéreos en su ambiente iónico (Bringmann y Reichenbach, 2001, García *et al.*, 2002).

La mayor parte de los astrocitos retinianos tienen su soma ubicado en la CCG y excepcionalmente, en la CNE. Dan soporte estructural y metabólico a la retina y participan en la detoxificación durante el proceso de envejecimiento (Ramírez *et al.*, 1996, Ramírez *et al.*, 2001).

La principal función de los oligodendrocitos es producir mielina, envoltura que confiere protección a los axones ópticos y que también es responsable de transmitir con rapidez el impulso nervioso para llevar a cabo el acto de la visión. Salvo excepciones no se localizan en la retina, pero son muy abundantes en el NO, donde mielinizan a los axones y los acompañan a lo largo de la vía óptica (Pinazo-Durán *et al.*, 1993, Strömmland y Pinazo-Durán, 1994, Strömmland y Pinazo-Durán, 2002).

Las células de la microglía están presentes en todas las capas retinianas y del NO. Se caracterizan por tener un pequeño soma celular y unos procesos cortos e irregulares. Su principal función es la de fagocitar las neuronas dañadas por alguna lesión y por tanto, se las considera como representantes del sistema inmunitario en el SNC (Ramírez *et al.*, 1996).

El nervio óptico

Está formado por la confluencia de los axones de las CGR y se encarga de enviar las señales eléctricas procedentes de la retina al SNC (Infeld y O'Shea, 1998). Funcionalmente comienza en las CGR cuyos axones se curvan en un ángulo de 90° para abordar la papila o disco óptico. Posteriormente, los axones continúan hacia el cerebro atravesando la esclera a nivel de la lámina cribosa y penetrando en el cráneo a través del agujero óptico de la cavidad orbitaria.

Su forma normal es redondeada o ligeramente ovalada y contiene una excavación fisiológica de distinto color llamada copa óptica, que suele ser inferior al 40% de su tamaño. El ratio entre el diámetro de la copa óptica y el disco óptico (RCD) es normalmente de 0,3 aunque un 6% de la población normal tienen un ratio superior a 0,5 (Kanski, 2007).

El aporte sanguíneo de las capas superficiales de la cabeza del NO proviene de las ramas pequeñas de la arteria central retiniana. La región preliminar, una pequeña parte anterior a la lámina cribosa, recibe el aporte sanguíneo de las arteriolas coroideas y las arterias ciliares posteriores cortas (Hayreh, 2001a, Hayreh, 2001b).

Carece de somas neuronales aunque sí posee los cuerpos de las células neurogliales, tanto macroglía como microglía. Además, los axones ópticos (cilindroejes de las CGR) en el NO maduro están mielinizados (Pinazo-Durán *et al.*, 1993, Pinazo-Durán *et al.*, 2011).

Vías visuales

Desde el agujero óptico, el NO se dirige medialmente para buscar el NO contralateral en el quiasma óptico, punto en el que se produce la decusación de las fibras correspondientes a las CGR de la hemirretina nasal; las correspondientes a la hemirretina temporal permanecen ipsilaterales. En la rata y el ratón, aproximadamente el 98,5% de los axones de las CGR se proyectan contralateralmente (Fleming *et al.*, 2006, Salinas-Navarro *et al.*, 2009). Las fibras que parten del quiasma forman los tractos ópticos que posteriormente sinapsarán con los puntos diana del SNC: el colículo superior (CS), el núcleo geniculado lateral (NGL), el núcleo intergeniculado, el núcleo terminal dorsal, lateral y medial, el núcleo pretectal y el núcleo supraquiasmático, desde donde salen las radiaciones ópticas hasta el córtex occipital (Sefton *et al.*, 2004) (Figura 3).

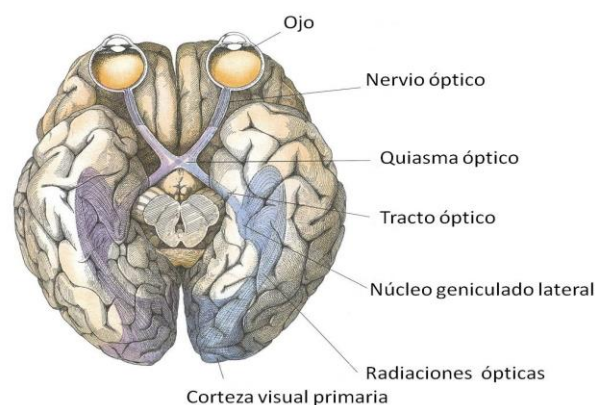


Figura 3. Anatomía de la vía visual (Hubel, 2000).

Glaucoma

El glaucoma es una enfermedad degenerativa y progresiva del NO que se caracteriza por la pérdida de CGR, atrofia del NO y pérdida de visión irreversible, que en las primeras fases resulta asintomática ya que es lenta y gradual (Distelhorst y Hughes, 2003, Adatia y Damji, 2005, Morrison *et al.*, 2008). Aunque típicamente afecta a las CGR, las neuronas de la CNI y la CNE también pueden verse afectadas (Bayer *et al.*, 2001c). La muerte de las CGR se produce por fenómenos de apoptosis, lo cual implica una pérdida progresiva de las mismas en relación con la pérdida de campo visual y disminución de la visión (Osborne *et al.*, 1999).

El glaucoma constituye la segunda causa de ceguera mundial por detrás de las cataratas y se estima que ocasionará pérdida de visión a 11,1 millones de personas en el 2020 (Quigley y Broman, 2006, Ray y Mookherjee, 2009). Su control tiene un gran impacto en nuestra sociedad en términos de morbilidad, pérdidas en la productividad y costes de salud (Infeld y O'Shea, 1998).

En Estados Unidos, la prevalencia de esta enfermedad ha ido aumentando a lo largo de la última década (Loyo-Berrios y Blustein, 2007) y se observa una tendencia similar por todo el mundo independientemente de la raza, pese a la fuerte tendencia al glaucoma severo de los afroamericanos e hispanos y al glaucoma de ángulo cerrado de los asiáticos.

Diagnóstico de glaucoma

El diagnóstico de glaucoma se basa en tres procedimientos exploratorios fundamentales: la medición de la PIO, el examen clínico del NO a través de la oftalmoscopia y la tomografía de coherencia óptica (OCT) y las pruebas funcionales (campo visual o perimetría) (Infeld y O'Shea, 1998, Distelhorst y Hughes, 2003, Khaw *et al.*, 2004a).

La presión intraocular

La PIO está determinada por el equilibrio entre la producción de HA en el interior del globo ocular y la salida del mismo a través de la malla trabecular. Muchos factores pueden afectarla, como por ejemplo la edad, la presión sanguínea sistémica, determinados factores genéticos o la administración tópica y sistémica de algunos fármacos. El registro de la PIO puede verse afectado por la época del año en la que se hacen las mediciones, la hora del día, la respiración y el método de determinación y de contención (Infeld y O'Shea, 1998).

La PIO media se ha establecido comparativamente con muestras muy grandes de la población entorno a 16 mm Hg; estando el rango normal entre 10-21 mm Hg. Este valor puede alcanzar valores cercanos a 0 mm Hg en situaciones de hipotonía extrema y valores cercanos a 70 mm Hg en algunos casos de glaucoma (Infeld y O'Shea, 1998, Khaw *et al.*, 2004a).

Con la edad se incrementa la PIO especialmente en las mujeres, pudiendo aumentar el rango hasta 24 mm Hg. Sin embargo, aproximadamente el 7% de la población por encima de los 40 años tiene una PIO superior a 21 mm Hg sin alteraciones compatibles con glaucoma (lesiones del campo visual o del NO); a estos pacientes se les conoce con el término de hipertensión ocular (Adatia y Damji, 2005, Kanski, 2007).

El rango a partir del cual la PIO puede producir daño en el NO es muy variable y depende de muchos factores. En general, presiones de 20-30 mm Hg producen daño a lo largo de muchos años y presiones de 40-50 mm Hg pueden producir una pérdida de visión súbita.

En condiciones normales la PIO está sometida a variaciones diurnas, siendo estas fluctuaciones más pronunciadas en los pacientes con glaucoma (To *et al.*, 2002).

Examen del disco óptico

Los cambios a nivel de la papila se han utilizado como pieza clave del diagnóstico morfológico del glaucoma pues frecuentemente aparecen antes que las alteraciones en los campos visuales (Distelhorst y Hughes, 2003). Conforme va aumentando la PIO y la isquemia, los orificios de la lámina cribosa de la esclera se van colapsando y los axones del NO se van muriendo. Al producirse la pérdida del tejido nervioso aparece la característica excavación o *cupping* de la cabeza del NO (Adatia y Damji, 2005). El aumento progresivo de la excavación papilar es una manifestación de la muerte del NO y del avance del glaucoma.

Entre los distintos cambios asociados al glaucoma que se pueden apreciar a nivel del NO mediante oftalmoscopia indirecta destacan el aumento simétrico del RCD (superior a 0,5) y una asimetría en el RCD entre los dos ojos de 0,2 o más. Otros hallazgos que se pueden encontrar son hemorragias en el disco óptico y muescas en la parte temporal del tejido neuroretiniano del NO (Khaw *et al.*, 2004a, Adatia y Damji, 2005, Kanski, 2007).

Desde hace tiempo son muchos los artículos publicados que demuestran que la OCT tiene una elevada sensibilidad y especificidad en el diagnóstico del glaucoma. Se trata de una técnica diagnóstica no invasiva similar a la ecografía en modo B que utiliza luz en vez de ultrasonidos para proporcionar imágenes de alta resolución de secciones transversales de la retina, y que por tanto permite valorar los cambios que suceden en la CCG y CFN (Kanski, 2007, Silva *et al.*, 2013, Xu *et al.*, 2013).

Examen del campo visual (perimetría)

Se realiza por medio de una serie de aparatos que evalúan la capacidad del paciente para detectar un estímulo diana que se produce en un campo definido, pudiéndose modificar el número de estímulos, la posición, la intensidad o la duración de los mismos. Es una prueba dinámica muy importante para detectar alteraciones en la visión central y periférica del paciente así como para monitorizar los cambios progresivos que tengan lugar en las visitas al oftalmólogo (Infeld y O'Shea, 1998).

Tipos de glaucoma

A pesar de que existen muchas clasificaciones del glaucoma, atendiendo a la etiología principalmente hablamos de glaucoma primario *versus* secundario; atendiendo a la anatomía de la cámara anterior hablamos de glaucoma primario de ángulo abierto (GPAA) *versus* glaucoma de ángulo cerrado (GAC) y atendiendo al momento de presentación, hablamos de glaucoma infantil, juvenil o adulto; en general éste se clasifica en tres grupos principales: el GPAA, el GAC y el glaucoma pediátrico (Ray y Mookherjee, 2009).

Glaucoma primario de ángulo abierto

Es la forma más frecuente en la especie humana representando el 90% de todas las formas de glaucoma (Adatia y Damji, 2005). Se produce como consecuencia de una alteración en el sistema de drenaje del HA que dificulta la salida del mismo. Por razones que no se comprenden del todo, la resistencia de la malla trabecular aumenta gradualmente y la PIO se eleva dentro del ojo.

Se trata de una condición bilateral aunque marcadamente asimétrica; es difícil de identificar en fases tempranas porque los pacientes no tienen síntomas y en el momento del diagnóstico se presentan en un estado muy avanzado de la enfermedad. Fisiológicamente se produce un solapamiento de los campos visuales entre los dos ojos que consigue esconder defectos tempranos y retrasar el diagnóstico hasta que el daño a nivel del NO compromete la visión central. Aproximadamente la mitad de los pacientes no saben que tienen la enfermedad ya que la pérdida del campo visual no se produce hasta que se deterioran más del 50% de las fibras nerviosas (Siu *et al.*, 2002, Adatia y Damji, 2005, Ray y Mookherjee, 2009).

Hasta la fecha son varias las teorías que se han propuesto sobre la patofisiología del mismo, que en definitiva es una enfermedad en la que participan múltiples factores: genéticos, ambientales y sistémicos (Ray y Mookherjee, 2009).

El GPAA está asociado al proceso fisiológico de envejecimiento (Gabelt y Kaufman, 2005). Recientemente se ha demostrado que a mayor edad hay una mayor degradación de los enzimas que en condiciones normales metabolizan y detoxifican el peróxido de hidrógeno y otros radicales libres. El estrés oxidativo secundario al acúmulo de estas sustancias da lugar a un deterioro irreversible en los tejidos oculares que puede comprometer la integridad de la malla trabecular, reduciendo la capacidad de adhesión celular y produciendo una pérdida de células que agrava la situación patológica (Zhou *et al.*, 1999).

Son muchos los trabajos de investigación que relacionan la patogénesis del glaucoma con un incremento en la síntesis de los componentes de la matriz extracelular (fibronectina, laminina o GAG) de la malla trabecular y del músculo ciliar, así como con una disminución de las metaloproteinasas que los degradan (Knepper *et al.*, 1996, Razeghinejad y Katz, 2012). Un ejemplo de ello son los GAG, que incrementan la resistencia a la salida del HA al ejercer fuerzas osmóticas que inducen un edema de la estructura trabecular (Knepper *et al.*, 1996). Otros trabajos de investigación sugieren que la interacción de los componentes de la matriz extracelular con diferentes proteínas induce la formación de depósitos que obstruyen la salida del HA a través de la malla trabecular (Bhattacharya *et al.*, 2005a, Bhattacharya *et al.*, 2005b).

Por otro lado, la disminución de las células presentes en los haces de la malla trabecular es un hecho característico de los pacientes que sufren GPAA, en los que se ha documentado un número menor de células por área de tejido que en las personas control (Grierson y Howes, 1987).

Numerosos estudios demuestran por otra parte que el aumento de la PIO provoca cambios en la expresión de ciertos genes que dan lugar al acúmulo de sustancias, como la interleuquina-6, que están implicadas en la permeabilidad vascular, remodelación de la matriz extracelular, reorganización del citoesqueleto y eliminación de radicales libres (González *et al.*, 2000, Pinazo-Durán, 2012).

El canal de Schlemm de los pacientes con glaucoma tiene menores dimensiones y menor densidad de poros en la pared interna del endotelio que el de los ojos normales, lo que contribuye a aumentar la resistencia a la salida del HA (Gabelt y Kaufman, 2005).

El factor de riesgo más importante, pero no el único, en la incidencia, severidad y progresión de esta patología es el aumento de la PIO (Bui *et al.*, 2005, Buys *et al.*, 2012, Gugleta *et al.*, 2012). Por otro lado existen pacientes con glaucoma normotenso y pacientes con hipertensión ocular que no presentan alteraciones visibles del NO y del campo visual (Stewart *et al.*, 2000, Flammer *et al.*, 2002). La identificación y cuantificación de los factores de riesgo es esencial para comprender y manejar esta enfermedad tanto desde un punto de vista de la salud pública como desde un punto de vista individual. Considerarlos de cara a instaurar un tratamiento puede hacer que la progresión sea más lenta (Le *et al.*, 2003, Loyo-Berríos y Blustein, 2007).

Según Distelhorst y Hughes (2003), los únicos factores de riesgo causales para el desarrollo del GPAA son el aumento de la PIO, los traumatismos oculares, la terapia con corticoides y la uveítis. Entre los factores de riesgo asociados al GPAA descritos por estos mismos autores y por Le *et al.* (2003) están la presencia de un familiar de primer grado con historia de glaucoma, la edad y la raza, con mayor prevalencia en los individuos de raza negra a partir de los 40 años y a partir de los

65 años en la raza blanca, aumentando el riesgo con cada década. Algunos estudios han demostrado que el aumento de riesgo entre descendientes se debe a factores genéticos y recientemente se han identificado varios genes relacionados con el GPAA en los adultos (Monemi *et al.*, 2005, Ray y Mookherjee, 2009).

Con el resto de factores existen muchas diferencias en función de los estudios; Distelhorst y Hughes (2003) relatan una mayor incidencia en las mujeres mientras que Le *et al.* (2003) y Loyo-Berríos y Blustein (2007) no vieron una relación directa entre el GPAA y el género. Las alteraciones hemodinámicas sistémicas se han considerado como una posible causa directa de daño del NO y pueden empeorar la situación en caso de que haya aumentos de la PIO; sin embargo, en el estudio de Le *et al.* (2003) se observó un mayor riesgo de padecer GPAA en aquellos pacientes que en alguna ocasión tomaron α -bloqueantes, pero no se demostró que hubiera una relación con el padecimiento de enfermedades cardiovasculares, el tabaquismo o la diabetes.

Otro factor que puede estar asociado al aumento del riesgo de padecer GPAA es el uso de esteroides para el tratamiento de las enfermedades inflamatorias o inmunomediadas. La vía de administración que con más frecuencia produce el llamado "glaucoma yatrogénico inducido por esteroides" es la tópica, la intraocular y la periocular, siendo la incidencia mucho menos frecuente tras la administración sistémica. El mecanismo exacto del glaucoma yatrogénico inducido por corticoides no se conoce exactamente aunque parece deberse a una mezcla de interacciones genéticas y factores ambientales, siendo los pacientes diagnosticados con GPAA los que más aumentos de PIO experimentan. La mayoría de casos se controlan médicamente aunque existe un 1-5% que necesitan tratamiento quirúrgico para controlar la PIO (Razeghinejad y Katz, 2012).

Los pacientes que padecen miopías moderadas a severas tienen un mayor riesgo de padecer GPAA; en las miopías leves esta relación no está tan clara. Actualmente no se sabe si el aumento del riesgo está asociado a una mayor PIO o a una mayor susceptibilidad de los ojos miopes al daño del NO, pues el mayor tamaño del globo ocular conlleva un adelgazamiento de la pared del mismo (Adatia y Damji, 2005, Loyo-Berríos y Blustein, 2007).

Existe un tipo de GPAA crónico en el que se sucede una pérdida progresiva de los campos visuales y un daño a nivel del NO a pesar de que la PIO siempre se encuentra por debajo de 21 mm Hg. Aparece en un 15%-20% de los pacientes y es más frecuente en las mujeres que en los hombres (Adatia y Damji, 2005, Park *et al.*, 2009).

Por otra parte, el GPAA puede ser secundario a otras patologías como uveítis anterior, la formación de neovasos en el iris, el glaucoma pigmentario o el facólitico (Infeld y O'Shea, 1998, Khaw *et al.*, 2004a).

Glaucoma de ángulo cerrado

En este tipo de glaucoma se produce un estrechamiento del ángulo iridocorneal. La lente se desplaza hacia la parte trasera del iris e impide la salida del HA desde la cámara posterior a la cámara anterior. El HA se acumula empujando el iris hacia la córnea y hacia la malla trabecular aumentando rápidamente la PIO (Khaw *et al.*, 2004a).

Entre los síntomas más frecuentes destacan el enrojecimiento y dolor intenso del ojo afectado, sensación de náuseas, vómitos y un fuerte dolor de cabeza. La visión se vuelve borrosa, disminuye la agudeza visual dependiendo del grado de edema corneal y la pupila se dilata y deja de responder a la luz (Khaw *et al.*, 2004b).

Este tipo de glaucoma se debe considerar como una urgencia oftalmológica y manejar rápidamente. Si no se trata se puede perder de manera irreversible la visión, crear adherencias permanentes del iris a la córnea y dañar la malla trabecular (Khaw *et al.*, 2004a).

Neuropatía óptica glaucomatosa

La neuropatía óptica glaucomatosa (NOG) agrupa a un conjunto de enfermedades heterogéneas, aunque clínicamente similares, que inducen una serie de cambios típicos en la CFN de la retina y en el disco óptico. Todas tienen en común una degeneración lenta y progresiva de las CGR y sus axones que ocasiona una pérdida funcional del campo visual. Aunque clásicamente se ha considerado que el daño de la NOG no afecta a otras neuronas de la retina, no todos los investigadores están de acuerdo con esta apreciación (Vidal-Sanz *et al.*, 2012).

Hasta la actualidad, son muchas las teorías que intentan explicar la pérdida de CGR en los pacientes con glaucoma; el estrés mecánico asociado al aumento de PIO y la consiguiente disminución de factores trópicos, la reducción del flujo sanguíneo a nivel de la retina, el daño por reperusión, el estrés oxidativo, la excitotoxicidad mediada por el glutamato y la activación del sistema inmunitario son las principales propuestas (Ray y Mookherjee, 2009). Estas teorías no son independientes ni excluyentes entre sí, siendo la patogénesis del glaucoma un hecho multifactorial.

Teoría mecánica

La teoría mecánica relaciona el incremento de la PIO con el alargamiento, estrechamiento y colapso de los orificios de la lámina cribosa, los cuales comprimen los axones a su paso por ella a nivel de la cabeza del NO (Berkelaar *et al.*, 1994, Quigley *et al.*, 1995, Doganay *et al.*, 2012).

La presión ejercida sobre el NO bloquea el envío de las señales neurotrópicas (que mandan factores de crecimiento, como por ejemplo el factor neurotrópico derivado del cerebro) procedentes del NGL o el CS. Estas señales mantienen las funciones de las CGR, lo cual puede suponer la lenta degeneración de las mismas (Ray y Mookherjee, 2009, Doganay *et al.*, 2012).

Es probable que la muerte de las células nerviosas retinianas y de sus axones se deba en parte a los fenómenos de apoptosis. La apoptosis, o muerte celular programada, es un proceso biológico fundamental que forma parte del ciclo vital celular. Sin embargo su activación inapropiada puede dar lugar a una pérdida patológica de células (García-Valenzuela *et al.*, 1995, Quigley *et al.*, 1995). Los mecanismos exactos por los que se induce la apoptosis en el glaucoma no se conocen del todo pero en último término se produce la destrucción de las CGR, sus axones y las células gliales de soporte que da lugar a la excavación típica de la cabeza del NO (Hernández, 2000).

Se ha comprobado que la muerte celular no sucede inmediatamente después del daño. Asimismo, el aumento de la PIO y la lesión mecánica a nivel de la lámina cribosa dañan los axones de las CGR antes que los cuerpos celulares, de manera que estas células son incapaces de cumplir con su función (envío de señales al centro visual del cerebro) antes de manifestar los cambios fenotípicos característicos (contracción de los somas celulares y reducción del tamaño) y generar los biomarcadores de apoptosis en sangre y HA (Morgan *et al.*, 2000, Pinazo-Durán, 2012).

El papel de la PIO es por tanto importante en el desarrollo de la lesión glaucomatosa. Sin embargo, aunque una reducción de la PIO mejora el pronóstico de los pacientes con esta enfermedad, no detiene la progresión de la misma en todos ellos (Stewart *et al.*, 2000, Flammer *et al.*, 2002).

Teoría vascular

Existen muchos trabajos que relacionan el glaucoma con una alteración del flujo sanguíneo ocular (FSO). La conclusión final de la mayoría de ellos es que en el glaucoma existe una menor perfusión ocular que disminuye conforme se incrementa el daño, tanto en fases tempranas como en avanzadas de la enfermedad (Flammer *et al.*, 2002). La reducción se produce en todos los

tejidos oculares pero especialmente se afectan la coroides, la cabeza del NO y el área peripapilar (Wolf *et al.*, 1993, Duijm *et al.*, 1997).

La verdadera cuestión está en si la alteración del FSO es una consecuencia de la enfermedad glaucomatosa, es decir, si el aumento de PIO altera el flujo sanguíneo produciendo una isquemia y finalmente la muerte celular o si se trata de un problema primario que puede estar implicado en la patogénesis de la misma (Flammer, 1994, Yan *et al.*, 1994, Flammer *et al.*, 2002, Ray y Mookherjee, 2009).

La posibilidad de que la reducción del FSO es tan sólo un problema secundario al aumento de PIO es improbable por las siguientes razones: la reducción del flujo sanguíneo va más allá del globo ocular, en algunos casos precede a la NOG y también se observa en los casos de glaucoma normotenso (incluso más pronunciada), por lo que una importante parte de la reducción del FSO es primaria (Flammer *et al.*, 2002).

Tres son las posibles causas de reducción del FSO: Un incremento en la resistencia del flujo sanguíneo, una reducción de la presión de perfusión y un incremento de la viscosidad sanguínea. En la literatura existe poco referenciado sobre el aumento en la viscosidad sanguínea, sin embargo un incremento en la resistencia puede estar asociado a variaciones anatómicas, vasculitis, arterioesclerosis o a una alteración funcional de la regulación del diámetro vascular. Una menor presión de perfusión puede estar asociada a un aumento en la PIO o a una menor presión sanguínea (Flammer *et al.*, 2002).

Daño por reperusión y estrés oxidativo

Las fluctuaciones en el flujo sanguíneo pueden ser un factor de riesgo decisivo para el desarrollo de la lesión glaucomatosa al producir pequeñas y repetidas lesiones por reperusión en las que aumenta la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y el estrés oxidativo (Flammer, 2001).

En condiciones normales, los radicales superóxido son retirados por los antioxidantes que están presentes en el globo ocular como por ejemplo el AA y la vitamina C. Sin embargo, numerosos estudios han revelado que en los pacientes con glaucoma hay una disminución en los niveles de las defensas antioxidantes (Zanón-Moreno *et al.*, 2008). Además, las ROS pueden reaccionar con el óxido nítrico (ON) produciendo peroxinitritos, una sustancia altamente reactiva y neurotóxica (Haefliger *et al.*, 1999).

Existe controversia sobre el papel del ON y las especies reactivas derivadas del mismo en la patogénesis de la NOG. A nivel experimental los estudios realizados concluyen que el ON constitutivo, formado en el globo ocular por la óxido nítrico sintasa (ONS), es beneficioso en la prevención de la génesis del glaucoma mientras que el exceso de ON producido por la óxido nítrico sintasa inducible (ONSi) debido a la acción de las endotoxinas, la inflamación y ciertas citoquinas, participa en la patogénesis y progreso de la NOG (Siu *et al.*, 2002, Toda y Nakanishi-Toda, 2007). Además, en varios modelos animales experimentales se ha comprobado que la inhibición farmacológica de la ONSi impide parcialmente el desarrollo de la NOG (Liu y Neufeld, 2000).

Excitotoxicidad mediada por el glutamato

El glutamato es un neurotransmisor que se encuentra en grandes cantidades en el SNC, incluido la retina y la vía visual, donde es responsable del 75% de la transmisión excitatoria (Honkanen *et al.*, 2003). Durante la sinapsis normal su acción finaliza rápidamente cuando es captado por las células gliales y las terminaciones nerviosas para transformarlo en glutamina (Nicholls y Attwell, 1990). Posteriormente la glutamina se libera al espacio extracelular de donde pasa al interior de las neuronas para ser reconvertida a glutamato.

Su efecto neurotóxico (excitotoxicidad) se descubrió por primera vez tras unos estudios experimentales realizados con ratones y posteriormente se ha determinado que participa en la patogénesis de algunas enfermedades neurodegenerativas (Casson, 2006).

Son varias las teorías que explican el exceso de glutamato en los pacientes con glaucoma. Las causas más comunes son la isquemia y el trauma crónico, secundarias al aumento de PIO, que dan lugar a un agotamiento de energía y al acúmulo extracelular de glutamato procedente de las células necróticas (Casson, 2006). Otra teoría es la relacionada con la glutaminasa, enzima encargada de la conversión de glutamina en glutamato, presente en condiciones normales en el interior de las células. Es posible que el aumento de presión sobre las CGR induzca un incremento en la permeabilidad de las membranas que exponga la glutaminasa intracelular y por tanto facilite la conversión de glutamina en glutamato. Por último, otra opción que facilita el acúmulo de este neurotransmisor es el hecho de que en el glaucoma se altera la capacidad de las células de Müller o de las CGR para detoxificarlo (Svenneby y Torgner, 1987).

El daño excitotóxico mediado por glutamato consiste en una cascada de acontecimientos en los que se pierde la homeostasis iónica y finalmente se produce la muerte celular. La activación

prolongada de los receptores para el glutamato; principalmente el subtipo N-metil-D-aspartato, a nivel de la membrana postsináptica induce un incremento en los niveles de Ca^{+2} en el citosol que facilita la apertura de los llamados poros de transición de las mitocondrias (Crompton, 1999). Este fenómeno permite el paso de ciertas sustancias, como el citocromo C o la endonucleasa G, que inician la cascada de apoptosis (Kroemer *et al.*, 2007). El daño en las mitocondrias da lugar a una producción de energía deficiente que ocasiona una disminución de la funcionalidad de las células nerviosas y un estado de “estrés energético” en el que las neuronas son más vulnerables al daño excitotóxico (Toda y Nakanishi-Toda, 2007). Además, el glutamato es capaz de desencadenar daño oxidativo y liberación de radicales libres al estimular la formación de ON activando la ONSi (Nickells, 2004).

A pesar de todo lo expuesto anteriormente, entre los diversos trabajos de investigación, clínicos y experimentales, existen discrepancias sobre los niveles de glutamato en el glaucoma (Dreyer *et al.*, 1996, Honkanen *et al.*, 2003, Okuno *et al.*, 2006, Doganay *et al.*, 2012).

Respuesta inmunitaria y papel de las células gliales

La respuesta inmune puede ser beneficiosa o perjudicial dependiendo de si hay un buen control de los mecanismos intrínsecos de regulación (Tezel *et al.*, 2007, Tezel, 2009). En condiciones normales, aparte de desempeñar otras funciones, las células gliales tienen la capacidad de regular la respuesta inmune en el SNC, la retina y el NO.

El incremento en los niveles de las ROS, que sucede durante el estrés oxidativo en los pacientes con glaucoma, induce la activación de las células T por parte de las células gliales aumentando la secreción de citoquinas proinflamatorias, como el factor de necrosis tumoral (TNF- α), que juegan un importante papel en la NOG (Tezel *et al.*, 2001a, Tezel *et al.*, 2001b, Tezel *et al.*, 2007).

La activación aberrante del sistema inmune conlleva una serie de consecuencias: por un lado las células T producen sustancias neurotóxicas que dañan las CGR, por otro lado se producen anticuerpos frente a varias proteínas neuronales identificándolas como extrañas, lo que induce cambios degenerativos severos (Ray y Mookherjee, 2009) y por último, se produce la activación del sistema de complemento que exacerba la muerte celular neuronal (Tezel *et al.*, 2007, Pinazo-Durán, 2012). Además las CGR lesionadas inducen una serie de reacciones en las células gliales que no se comprenden del todo. Entre los cambios que se observan destaca una hipertrofia de los astrocitos, un adelgazamiento de los cuerpos celulares y los procesos primarios y una menor cantidad de procesos secundarios (Ramírez *et al.*, 2010). Las células gliales dañadas exacerban el

daño neuronal debido a que se altera la captación de glutamato y a que se liberan citoquinas y ROS que inician un círculo vicioso (Kawasaki *et al.*, 2000).

Identificación, cuantificación y distribución de las CGR

La identificación, cuantificación y distribución de las CGR de los roedores, tanto en condiciones normales como patológicas, se hace esencial en el estudio de numerosas neuropatías entre las que destaca la glaucomatosa. Además, el fácil manejo experimental de estos animales y el extenso conocimiento que se tiene de la anatomía, organización, función y estructura molecular de su vía visual primaria permiten la realización de muchos trabajos (Pinazo-Durán *et al.*, 1993, Strömland y Pinazo-Durán, 1994, Vidal-Sanz *et al.*, 2000, Vidal-Sanz *et al.*, 2001, Lafuente *et al.*, 2002, Strömland y Pinazo-Durán, 2002, Pinazo-Durán *et al.*, 2011, Vidal-Sanz *et al.*, 2012).

El primer paso para poder realizar el estudio cuantitativo y distributivo de las CGR es su identificación y diferenciación con respecto a las células amacrinas desplazadas. En roedores éstas se encuentran en igual proporción en la CCG y no son fácilmente distinguibles según la morfología

o el tamaño celular (Perry, 1981, Perry *et al.*, 1983, Silveira *et al.*, 1989). Además, las CGR lesionadas pueden cambiar su fenotipo y ser más complicado todavía su diferenciación de otros tipos neuronales (Sellés-Navarro *et al.*, 1996).

Existen varios sistemas de identificación: los que emplean criterios morfológicos, los basados en la aplicación de trazadores neuronales y los que detectan marcadores moleculares.

Identificación según criterios morfológicos

Este sistema se basa en analizar secciones histológicas o retinas montadas en plano mediante la utilización de tinciones celulares inespecíficas y la microscopía óptica. Debido a que puede existir una superposición de tamaño entre las células amacrinas grandes y las CGR pequeñas (Perry, 1981), los criterios anatómicos basados en el tamaño del soma neuronal son menos precisos. Sin embargo, puesto que permiten estudiar las características macroestructurales de las capas de la retina, incluida la CCG y CFN, se recomienda realizarlos en paralelo a otras técnicas (Pinazo-Durán *et al.*, 1993, Pinazo-Durán *et al.*, 1997, Pinazo-Durán *et al.*, 2011).

Identificación mediante la aplicación de trazadores neuronales

Las CGR se proyectan a través de sus axones a varias zonas del SNC. Los principales sitios son los CS (en la rata reciben el 98% de la población de CGR) y los NGL (Salinas-Navarro *et al.*, 2010, Salinas-Navarro, 2011).

Aplicando sobre estas áreas o sobre el NO un trazador neuronal, éste es captado por los axones de las CGR y transportado retrógradamente hasta el soma celular en la retina, permitiendo así identificar estas células fácilmente (Vidal-Sanz *et al.*, 2012). Este sistema permite la caracterización inequívoca de las CGR ya que son las únicas células de la retina que emiten un único axón retinofugal (Salinas-Navarro, 2011).

Se han utilizado varios tipos de trazadores: peroxidasa de rábano (Perry, 1981), carbocianinas (Vidal-Sanz *et al.*, 1988), 4Di-10ASP (Lafuente *et al.*, 2002), *Fast Blue* (Vidal-Sanz *et al.*, 1988), y Fluorogold (FG) o su análogo Metanesulfonato de hidroxistilbamidina, que es una molécula con propiedades de fluorescencia similares al FG (Cheung y Morris, 2005, Salinas-Navarro *et al.*, 2009).

Para que una sustancia actúe como un trazador neuronal retrógrado debe acumularse en las fibras nerviosas y retenerse en el soma celular (Wessendorf, 1991). En la actualidad, el FG o su análogo son los neurotrazadores más utilizados en la mayoría de laboratorios (Ko *et al.*, 2001, Danias *et al.*, 2002, Danias *et al.*, 2006, Nadal-Nicolás *et al.*, 2009, Vidal-Sanz *et al.*, 2012). Su marcada fluorescencia amarilla en el interior de los lisosomas y el citoplasma, su capacidad para llenar los procesos dendríticos y su compatibilidad con las pruebas de inmunocitoquímica han permitido que su uso esté muy extendido (Wessendorf, 1991). Ambos se transportan activamente, a través de vesículas, desde los axones hasta el soma y las dendritas primarias donde permanecen hasta 3-4 semanas sin difundir transcelularmente o decolorarse (Schmued y Fallon, 1986, Wessendorf, 1991, Sellés-Navarro *et al.*, 1996, Cheunsuang y Morris, 2005).

Identificación mediante marcadores neuronales específicos

Las CGR pueden identificarse mediante inmunodetección de las proteínas específicamente expresadas por ellas o por hibridación para detectar su ARN mensajero. Entre los distintos marcadores que existen destacan: MAP1A (McKerracher *et al.*, 1989), γ -synuclein (Surgucheva *et al.*, 2008a, Surgucheva *et al.*, 2008b), Bex1/2 (Bernstein *et al.*, 2006), Thy-1 (Chidlow *et al.*, 2005), NeuN (Buckingham *et al.*, 2008), Brn3a (Nadal-Nicolás *et al.*, 2009, Vidal-Sanz *et al.*, 2012) y Brn3b (Fu y Sretavan, 2010).

Los marcadores deben cumplir ciertas condiciones: ser expresados específicamente por las CGR y no por otras células de la retina y que no cambie su patrón de expresión tras la lesión retiniana (Salinas-Navarro, 2011).

La familia de los factores de transcripción Brn3 con dominio POU (Brn3a, Brn3b y Brn3c) juega un papel muy importante en la diferenciación, supervivencia y elongación de los axones de las neuronas de la retina, el oído interno y el trigémino. En la retina se expresan únicamente en las CGR, en las que cada factor Brn3 regula por separado y de manera superpuesta el conjunto de genes necesarios para la formación de la red axonal final (Wang *et al.*, 2002).

El más abundante de los Brn3 es el Brn3a. En los estudios realizados por el grupo de investigación de Nadal-Nicolás *et al.* (2009) se demostró que el Brn3a se expresaba en un 92,2% de las CGR trazadas con FG y se consideró como un marcador específico y fiable para detectar y cuantificar estas células en la retina normal y lesionada por axotomía de la rata adulta. Respecto al Brn3b, éste se expresa en el 65% del total de la población de CGR de la rata y el Brn3c en el 51%. El nivel de co-expresión de Brn3 alcanza el 70% de la población de CGR. De este porcentaje,

la mayoría de células expresan los tres tipos de marcadores y una minoría sólo expresa uno de ellos, siendo en este caso el Brn3a el marcador más abundante seguido del Brn3b (Nadal-Nicolás *et al.*, 2012). El hecho de ser un marcador nuclear presenta ventajas con respecto a otros, como por ejemplo el Bex1/2, que es expresado en los somas celulares y en los axones de las CGR y por tanto no puede usarse para un análisis cuantitativo (Nadal-Nicolás *et al.*, 2009).

La inmunodetección de las CGR mediante anticuerpos específicos tiene ciertas ventajas sobre la utilización de los trazadores neuronales. En primer lugar no manipula el sistema visual antes de la obtención de las retinas, evitando así una alteración del mismo y acortando la fase experimental (Salinas-Navarro, 2011). En segundo lugar, no produce interferencia con aquellas células de la microglía que hayan podido fagocitar a las CGR lesionadas marcadas previamente con el trazador (Sellés-Navarro *et al.*, 1996, Nadal-Nicolás *et al.*, 2009). Por otro lado, permite la detección de las CGR lesionadas que no serían identificadas mediante trazadores neuronales, ya que éstos sólo marcan las neuronas que mantienen el transporte axonal intacto (Avilés-Trigueros *et al.*, 2003). En estas situaciones el Brn3a se convierte en la técnica de elección para determinar la supervivencia de las CGR (Vidal-Sanz *et al.*, 2012).

Cuantificación de las células ganglionares de la retina

La cuantificación de las CGR se puede realizar directamente sobre las secciones transversales o los montajes a plano de la retina o indirectamente sobre las secciones transversales del NO (Dantias *et al.*, 2002, Dantias *et al.*, 2006, Salinas-Navarro, 2011).

El conteo manual de todas las CGR es imposible de realizar en los montajes a plano de la retina. Por esta razón, se efectúa por áreas de muestra tomadas de forma estándar en regiones representativas (central, media y periférica). El número total de CGR se obtiene extrapolando los valores obtenidos al área total de la retina. En las secciones transversales este procedimiento es menos preciso aunque recientemente se han hecho aproximaciones estereológicas con buenos resultados. Los principios estereológicos, que incluyen un método de conteo sistemático y randomizado que no depende del tamaño, forma o distribución del tejido, permiten una estimación precisa del número total de células incluso cuando se cuenta una pequeña fracción de la muestra (Fileta *et al.*, 2008).

El conteo automático de células trazadas con FG o inmunodetectadas con Brn3a es un procedimiento rápido, objetivo y reproducible que permite obtener el número exacto de CGR de muchos globos oculares (Dantias *et al.*, 2002, Nadal-Nicolás *et al.*, 2009, Salinas-Navarro *et al.*,

2009). Evita la pérdida de información que se produce mediante los métodos de muestreo, ya que en éstos el área analizada normalmente no supera el 15% del total (Laquis *et al.*, 1998, Salinas-Navarro *et al.*, 2010). Por otro lado, al estudiar la totalidad de la retina permite tener en cuenta la distribución heterogénea de las CGR, cuya densidad disminuye conforme aumenta la distancia de la cabeza del NO (Danias *et al.*, 2002). Además, aunque no existe un método de contaje celular perfecto (Guillery, 2002), los métodos automáticos no producen sesgos pues se realizan con el software del programa de análisis (Salinas-Navarro *et al.*, 2009).

La densidad de las CGR se obtiene dividiendo el número total de células entre el área retiniana en el caso del contaje automático o extrapolando la densidad del área muestreada al área total de la retina, en caso del contaje manual (Salinas-Navarro, 2011).

El método indirecto de cuantificación, basado en el contaje de los axones en las secciones transversales del NO, parte de la premisa de que las CGR tienen un único axón retinofugal. Se puede realizar bajo el microscopio óptico de luz transmitida, a través de áreas de muestreo (Levkovitch-Verbin *et al.*, 2002) o cuantificando el número total de axones por métodos semiautomáticos de análisis de imagen; o bajo el microscopio electrónico de transmisión, donde se cuenta manualmente los axones de las áreas muestreadas tras identificarlos por las vainas de mielina y los microtúbulos para posteriormente extrapolar los resultados (Chauhan *et al.*, 2002).

A pesar de que los estudios realizados demuestran que los resultados obtenidos mediante el microscopio electrónico de transmisión son superiores a los obtenidos con el microscopio de luz, este método se basa en técnicas de muestreo que normalmente cuentan menos de un 20% de los axones, requiere una gran experiencia en la identificación de los axones no mielinizados, es tedioso y además no aporta información sobre el tamaño del soma neuronal, característica que puede cambiar en determinadas situaciones patológicas (Danias *et al.*, 2002, Salinas-Navarro, 2011).

Distribución de las células ganglionares de la retina

Puesto que la densidad de las CGR no es homogénea y depende de la región analizada, es importante estudiar la distribución de estas células sobre las retinas montadas a plano mediante mapas de densidad o de isodensidad (Salinas-Navarro, 2011). Estos mapas son representaciones de la retina realizadas con un código de colores en función de la densidad celular (Danias *et al.*, 2002, Danias *et al.*, 2006). Cuanto más pequeñas y más numerosas son las áreas de muestreo más preciso es el mapa de densidad. Cuando se tiene un número suficiente de áreas muestreadas y se

unen las de igual densidad, se obtiene un mapa de isodensidad, que proporciona una información más completa (Salinas-Navarro, 2011).

La construcción de los mapas de densidad se puede realizar a partir de contajes manuales calculando la densidad de las áreas de muestreo (situadas en las regiones centrales, medias y periféricas) y representando los valores. Sin embargo, teniendo en cuenta que en muchas patologías la pérdida de CGR no se produce de manera uniforme, este método es lento, poco preciso y genera falta de información ya que sólo muestrea una pequeña porción de la retina.

Mediante el método automático de contaje se puede generar una distribución completa y precisa de todas las CGR, ya que utiliza muchas áreas de pequeño tamaño que cubren toda la superficie de la retina. Es rápido y exacto por lo que permite valorar muchas retinas en poco tiempo y comparar la variabilidad entre individuos (Salinas-Navarro, 2011).

Detección de apoptosis de las células ganglionares de la retina: técnica TUNEL

La apoptosis es una forma activa de muerte celular programada genéticamente como respuesta a señales moleculares externas o internas, que fue identificada debido a sus características morfológicas por Kerr *et al.* (1972). Se trata de un suicidio celular que puede obedecer a causas naturales y patológicas.

A pesar de estar implicada en numerosas enfermedades oftalmológicas como por ejemplo el glaucoma, la retinitis pigmentosa, la degeneración macular, el desprendimiento de retina, la retinopatía diabética y la miopía patológica (Chakravarthy *et al.*, 1993, Osborne *et al.*, 1999, García y Vecino, 2003, Quintyn *et al.*, 2006, Senin *et al.*, 2006, Carrasco *et al.*, 2008, Levin y Peeples, 2008, Varma *et al.*, 2008, Pinazo-Durán, 2012), no se conocen las causas ni los mecanismos por los que este proceso se produce y por consiguiente, no existe la forma de prevenir su aparición o tratar estas enfermedades en base a su origen apoptótico. La característica histopatológica fundamental es la lesión progresiva y la muerte celular de grupos neuronales. Los hallazgos citopatológicos incluyen la presencia de cuerpos apoptóticos y cúmulos de neurofilamentos en los axones (Johnson *et al.*, 2007). Los cambios morfológicos durante la apoptosis son varios: fragmentación del ADN cromosómico, condensación de la cromatina, acidificación del citoplasma y ruptura nuclear. La célula termina por fragmentarse y al ser reconocida y fagocitada por macrófagos o células vecinas, son retiradas del tejido en cuestión (Jacobson *et al.*, 1997).

Existen varios métodos para detectar la presencia de apoptosis; éstos se clasifican en dos tipos: los que permiten objetivar la presencia o ausencia en un determinado tejido y los que analizan la expresión de diferentes genes que controlan el proceso. Uno de los métodos más utilizados para estudiar la apoptosis es la técnica TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated d UTP-biotin nick end labeling*), descrita por Gavrieli *et al.* (1992). Esta técnica permite determinar la presencia de fragmentación de DNA en células individuales, por lo que es posible conocer la proporción de células que están muriendo por apoptosis en un determinado momento. Por otra parte, durante la necrosis también se produce degradación de DNA que no presenta el patrón de degradación internucleosomal típico de la apoptosis por lo que no es posible de distinguir por este método y se recomienda complementarlo con otras técnicas, como la evaluación morfológica (Pons-Vázquez *et al.*, 2008) o la expresión de biomarcadores de apoptosis en tejidos o fluidos (Pinazo-Durán, 2012).

Evaluación electrodiagnóstica de la visión: electrorretinografía en la rata

Las pruebas electrodiagnósticas permiten evaluar el sistema visual desde la retina al córtex de una manera no invasiva. El electrorretinograma (ERG) o también llamado flash ERG, es el más utilizado en medicina veterinaria y en los animales de experimentación para diagnosticar las enfermedades del segmento externo de la retina. Los potenciales visuales evocados (PVE) que proceden de la respuesta cortical, se utilizan con menos frecuencia e indican una alteración visual post retiniana (Ekesten, 2007). El *pattern* ERG (PERG) se ha consolidado en los últimos años como una de las pruebas más útiles para evaluar la función de las CGR. Tiene especial importancia en medicina humana porque permite detectar alteraciones específicas de la mácula y los segmentos internos de la retina que pueden pasar desapercibidas con el flash ERG (Bach, 2001). Sin embargo,

en medicina veterinaria y en investigación con animales de laboratorio no se suele realizar ya que, excepto el mono, carecen de mácula y además es un procedimiento técnicamente complicado (Fortune *et al.*, 2004). El ERG multifocal se utiliza para registrar la respuesta de los conos en varias áreas de la retina pero al igual que el PERG, es difícil de realizar (Ekesten, 2007).

El flash ERG

Ya en 1865 Holmgren descubrió cómo un estímulo luminoso podía provocar cambios en el potencial eléctrico de la retina (Perlman, 2001). A principios del siglo XX, Gotch (1903) describió el primer ERG como un flash de luz que producía una onda negativa seguida de una positiva de mayor amplitud. Posteriormente la primera onda negativa del ERG se llamó onda a, la siguiente onda positiva onda b y la consecutiva onda positiva onda c. Granit (1933) contribuyó al entendimiento del origen de las curvas del ERG en un estudio realizado con gatos anestesiados con éter y finalmente en 1945, se puso de manifiesto el verdadero potencial del ERG como herramienta diagnóstica de enfermedades oculares en medicina humana tras lo cual, se desarrollaron diversas investigaciones en medicina veterinaria (Parry *et al.*, 1953).

El flash ERG proporciona resultados más objetivos que la oftalmoscopia y aporta información en fases más tempranas de la enfermedad, por lo que permite emitir un diagnóstico precoz (Ekesten, 2007). Desde un punto de vista práctico, es más fácil de realizar que el PERG, ya que no requiere la corrección del poder de refracción ni localizar exactamente la fovea en la especie humana. Además se ha demostrado como un método válido para detectar alteraciones retinianas asociadas al glaucoma (Bayer *et al.*, 2001b, Bayer *et al.*, 2001c, Bui *et al.*, 2005, Moreno *et al.*, 2005).

Origen de las curvas del ERG

El ERG representa la respuesta eléctrica que genera la retina cuando es estimulada por un breve estímulo de luz. Está compuesto por una serie de curvas que se caracterizan por su morfología y amplitud (Perlman, 2001).

La onda a

Es el primer componente del ERG y tiene una polaridad negativa (Figura 4). Hasta la actualidad, se consideraba que estaba generada por una respuesta mixta de los dos tipos de fotorreceptores: los conos y los bastones. Posteriormente se ha comprobado que tiene un origen complejo dependiendo de la intensidad lumínica del estímulo, de la luminosidad de la sala y del tiempo de adaptación a la luz y a la oscuridad (Robson *et al.*, 2003).

La anatomía y fisiología de la retina varía entre las diferentes especies dando lugar a diferencias en la población de fotorreceptores que se deben tener en cuenta a la hora de diseñar el protocolo de ERG (Rosolen *et al.*, 2005).

La onda b

Es la onda más importante que observamos en el ERG, tiene polaridad positiva (Figura 4) y está generada por las células de Müller y las células bipolares (Xu y Karwoski, 1994, Perlman, 2001). Puede considerarse por tanto, como una medida de la función de la retina media, especialmente de la CNI (Velten *et al.*, 2001a).

Los potenciales oscilatorios

Son una serie de ondas superpuestas de alta frecuencia y poco voltaje que aparecen en la parte ascendente de la onda b (Figura 4). Su origen está todavía investigándose y existen discrepancias entre los diversos estudios (Wachtmeister, 1998, Dong *et al.*, 2004, Liu *et al.*, 2006). Clásicamente los PO tempranos se han asociado a la actividad de los fotorreceptores y las células bipolares de la retina externa y los PO tardíos se han atribuido a los segmentos internos de la retina a nivel de la MPI, donde los axones de las células bipolares, los procesos de las células amacrinas y las dendritas de las CGR parecen estar involucrados en su generación (Wachtmeister, 1998). Estudios más recientes sin embargo, ponen de manifiesto que los PO tempranos, intermedios y tardíos, son principalmente generados por los fotorreceptores mientras que las células bipolares o las horizontales contribuyen muy poco (Dong *et al.*, 2004).

Comparados con otros elementos del ERG, los PO son significativamente más sensibles a cualquier alteración del entorno retiniano (Wachtmeister, 1998). La respuesta de los mismos depende de la circulación de la retina y por tanto se alteran en situaciones de isquemia como por

ejemplo en la retinopatía diabética, la degeneración macular o el glaucoma, en el que disminuye su amplitud y aumenta su latencia cuando se eleva la PIO (Wachtmeister, 1998, Ekesten, 2007).

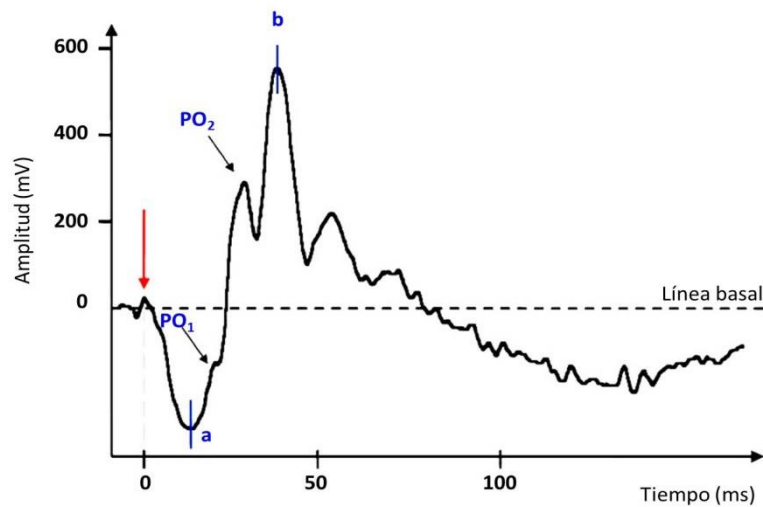


Figura 4. Parámetros y medidas de un ERG escotópico en la rata. La primera onda negativa tras el estímulo del flash (representado por una flecha roja) es la onda a, que viene seguida de una onda positiva llamada onda b. Los PO están presentes en la parte ascendente de la onda b y su número puede variar dependiendo de la intensidad del estímulo. Cada onda se caracteriza por la amplitud (mV) y por su pico de latencia (ms). Figura modificada de Rosolen *et al.* (2005).

Umbral de respuesta escotópica

Se trata de una respuesta que se puede observar en el ERG escotópico tras un estímulo muy débil (cercano al umbral escotópico) en numerosas especies (Sieving *et al.*, 1986, Sieving y Nino, 1988, Bui y Fortune, 2004). Refleja la actividad de la retina proximal, probablemente de la MPI y la CNI y está mediado por la acción de las células de Müller.

El grupo de investigación de Bui y Fortune (2004) demostró que el umbral de respuesta escotópica (STR) en la rata depende directamente del buen funcionamiento de las CGR por lo que esta parte del ERG se ha propuesto como una herramienta para investigar las alteraciones funcionales de la retina en los modelos experimentales de glaucoma.

Procedimiento

Preparación del animal

A diferencia de medicina humana, los animales deben ser anestesiados durante todo el proceso para mantener una fijación estable de los electrodos y minimizar los artefactos asociados al movimiento y al estrés. El protocolo anestésico debe estar estandarizado para obtener resultados reproducibles ya que las respuestas del ERG están influenciadas por la anestesia general, siendo la disminución en la amplitud y el aumento en la latencia el efecto que se observa con más frecuencia (Yanase y Ogawa, 1997).

La ventilación y la temperatura corporal deben ser monitorizadas pues pueden inducir cambios en los resultados. Los párpados deben mantenerse abiertos y las pupilas estar totalmente dilatadas con la intención de proporcionar la máxima iluminación a la retina (Rosolen *et al.*, 2005).

Estimulación lumínica

Se recomienda utilizar un difusor de luz que consiga una iluminación constante y uniforme de la retina. El uso de una cúpula de campo completo (llamada *Ganzfeld* en alemán) construida con un fotoestimulador que permita estimular los dos ojos a la vez es aconsejable ya que permite registrar los datos bajo las mismas condiciones de adaptación y profundidad anestésica (Fortune *et al.*, 2004). La estimulación lumínica monocular también es ampliamente utilizada, sobre todo cuando se estudia el efecto sistémico de algún fármaco o tóxico (Rosolen *et al.*, 2005).

Adquisición de la señal: filtros y electrodos

Las señales eléctricas de la retina son pequeñas en amplitud (normalmente menos de 10^{-1} mV) por lo que deben ser ampliadas para obtener una respuesta cuantificable. El promedio de las señales reduce el impacto del ruido y los filtros de banda ancha atenúan las frecuencias que no son atribuibles al ERG (Rosolen *et al.*, 2005). Las respuestas poco contaminadas, que no requieren manipulación posterior, aumentan el potencial diagnóstico del ERG por lo que mantener el aparato siempre en la misma zona, alejado de enchufes, monitores o campos electromagnéticos contribuye a una mejor interpretación de los resultados (Ekesten, 2007).

Los cambios eléctricos producidos por la estimulación de la luz se registran mediante un electrodo activo en contacto con la córnea tras la instilación de colirio anestésico. Existen varios tipos para tratar de acomodarlos a las diferentes especies y a sus correspondientes curvaturas corneales (Sagdullaev *et al.*, 2004, Ekesten, 2007). En roedores el mejor para registrar el ERG es el electrodo de contacto corneal elaborado con filamentos de oro, aunque tiene el inconveniente de que se manipula con más dificultad en condiciones de oscuridad (Bayer *et al.*, 2001a). El espacio entre el electrodo activo y la córnea se debe rellenar con una solución salina o viscoelástica, para evitar las lesiones corneales y favorecer la conducción eléctrica. El electrodo de referencia (pasivo) puede estar en contacto con el borde palpebral o en el espacio subcutáneo de la base del cráneo. El electrodo de tierra se suele colocar en la cola o en el espacio subcutáneo de la zona interescapular (Rosolen *et al.*, 2005).

Es recomendable medir la impedancia para asegurar que los electrodos, especialmente el de tierra y el de referencia, tienen un buen contacto con los tejidos. Es aconsejable que se encuentre alrededor de los 5 kOhms y que no supere los 7 kOhms (Rosolen *et al.*, 2005, Ekesten, 2007).

Interpretación de los resultados

El ERG debe incluir una valoración subjetiva de las formas de las curvas, como por ejemplo que el trazado se diferencie del ruido o que haya simetría entre los dos ojos, y una valoración objetiva que debe basarse en (Rosolen *et al.*, 2005) (Figura 4):

- Amplitud de la onda a (μV): medida desde la base hasta el punto más bajo.
- Amplitud de la onda b (μV): medida desde el punto más bajo de la onda a hasta el punto más alto de la onda b.
- Tiempos de latencia de las ondas a y b (ms): medido desde el inicio del estímulo hasta el punto más bajo de la onda a y el punto más alto de la onda b respectivamente.
- Las principales curvas de los PO (μV): el método tradicional consistía en calcular la amplitud de cada onda individual de la misma manera que para la onda b. Sin embargo, resulta difícil evaluar las amplitudes de las curvas pequeñas al principio y al final de las oscilaciones porque sus valores son reducidos y están cerca de los niveles del ruido. Recientemente algunos investigadores miden la amplitud negativa y positiva de los PO empezando desde la base y utilizando la suma de las amplitudes de cada uno de ellos como una estimación de la amplitud total (Wachtmeister, 1998, Zhang *et al.*, 2007).

Existe una gran variedad de protocolos dependiendo del objetivo del estudio y de si los animales son especies nocturnas o diurnas (protocolos escotópicos y fotópicos). Los roedores son nocturnos y necesitan una adaptación a la oscuridad de aproximadamente 12 horas por lo que en estos animales es esencial la preparación de todo el procedimiento en oscuridad (Rosolen *et al.*, 2005). El protocolo más utilizado para evaluar la función retiniana en roedores es el escotópico con cúpula de campo completo (Fortune *et al.*, 2004).

Aplicaciones del ERG

Multitud de enfermedades retinianas provocan alteraciones en el ERG. Las patologías degenerativas o hereditarias de los fotorreceptores o los problemas vasculares como la diabetes y la hipoxia alteran las ondas y los PO (Velten *et al.*, 2001b).

ERG en glaucoma

El ERG puede ser útil en pacientes en fases iniciales de glaucoma en los que tanto la PIO como la perimetría son normales (Korth, 1997).

Por todos es sabido que el glaucoma daña principalmente la CCG. Sin embargo, antes de la muerte apoptótica de las CGR, la retina glaucomatosa exhibe cambios que se pueden monitorizar mediante la respuesta electrofisiológica (Bayer *et al.*, 2001b). Los métodos electrodiagnósticos aportan además varias ventajas como por ejemplo: la capacidad de analizar varias partes de la retina por separado (lo que permite localizar los déficits funcionales) y ser muy objetivos, ya que en las personas los resultados no dependen de sus habilidades cognitivas (Korth, 1997). Un gran número de investigaciones electrofisiológicas tratan de responder a la pregunta de si la lesión glaucomatosa afecta a las capas retinianas externas, concretamente a los fotorreceptores o si se limita a las capas más internas (Velten *et al.*, 2001a, Velten *et al.*, 2001b).

Las alteraciones funcionales de la retina pueden estar asociadas a una pérdida de las células o sólo a un empeoramiento funcional de las mismas; esta diferenciación únicamente puede hacerse mediante técnicas histológicas (Velten *et al.*, 2001a, Velten *et al.*, 2001b).

El PERG es un indicador directo de la función de las CGR y se ha consolidado como un método sensible para detectar cambios funcionales tempranos asociados al glaucoma en la especie humana (Moreno *et al.*, 2005). Sin embargo, como se ha comentado anteriormente, en medicina

veterinaria y en investigación con animales de laboratorio no se suele realizar ya que, excepto el mono, carecen de mácula y además es un procedimiento técnicamente complicado

El flash ERG refleja la actividad de las neuronas retinianas distales a las CGR y en el pasado se consideraba que no estaba afectado por la enfermedad glaucomatosa (Korth, 1997). Sin embargo, son muchos los estudios que han puesto de manifiesto una disminución de la amplitud de los PO y la onda a y b junto con un aumento de la latencia de la onda b en diferentes modelos animales (Mittag *et al.*, 2000, Bayer *et al.*, 2001a, Bayer *et al.*, 2001b, Bayer *et al.*, 2001c, Velten *et al.*, 2001a, Velten *et al.*, 2001b, Chauhan *et al.*, 2002, Moreno *et al.*, 2005, Salinas-Navarro *et al.*, 2009). Este hecho demuestra que la elevación de la PIO y la isquemia producen alteraciones severas a nivel de la CNE y CNI que afectan al ERG (Bui *et al.*, 2005, Salinas-Navarro *et al.*, 2009).

Metabolómica: una visión general

La metabolómica es la disciplina de investigación que engloba el estudio del metaboloma: conjunto de pequeñas moléculas o metabolitos que están presentes en las células, tejidos, órganos o fluidos orgánicos (Nicholson *et al.*, 1999). Analiza productos intermedios del metabolismo, así como carbohidratos, péptidos y lípidos derivados de la dieta o de los procesos patológicos (Young y Wallace, 2009). La identificación, concentración y variación de estos compuestos es el resultado de la interacción compleja entre la expresión de los genes, las proteínas y el ambiente (Kaddurah-Daouk *et al.*, 2008). De la misma manera que la genómica estudia la expresión de los genes y la proteómica la expresión de las proteínas, la metabolómica estudia las consecuencias de la actividad de estos genes y estas proteínas con menor coste económico y en menos tiempo (Nicholson *et al.*, 1999, Young y Wallace, 2009).

Una vez se ha recolectado la muestra, el estudio comienza con la extracción de las pequeñas moléculas y su posterior análisis mediante técnicas de espectroscopia avanzadas que separan y cuantifican las partículas de interés. Entre estas técnicas destacan la espectrometría de masa (EM), la resonancia magnética nuclear (RMN) y la cromatografía de líquidos o gases.

Resonancia magnética nuclear

La RMN de alta resolución se ha utilizado previamente para identificar y cuantificar numerosas sustancias mediante la comparación de los datos espectroscópicos obtenidos con librerías de referencia procedentes de compuestos puros (Nicholson *et al.*, 1984, Weljie *et al.*, 2006). Permite el análisis de múltiples metabolitos rápida y simultáneamente, requiere muy poco tratamiento previo de la muestra (se añade solamente una solución estándar de referencia y D₂O) y no la altera, por lo que puede utilizarse para otros análisis (Brown *et al.*, 1986, Midelfart, 2009).

Aprovecha las propiedades magnéticas del núcleo atómico para identificar a un metabolito específico en la muestra dependiendo del número y tipo de entidades químicas de la molécula (Lewis *et al.*, 2008). La información obtenida proviene principalmente de los protones de las moléculas aunque también podemos obtenerla de otros núcleos igualmente presentes en los sistemas vivos (¹³C, ¹⁵N, ³¹P...). Este análisis genera un espectro que se caracteriza por las posiciones de los picos de resonancia, también llamadas desplazamientos químicos, y por la intensidad y las multiplicidades (distintos picos de una sustancia dependiendo del entorno que la rodea) de los mismos (Figura 5). De esta forma, cada metabolito puede presentar varias señales pero cada señal sólo puede corresponder a un átomo de hidrógeno de un tipo concreto de molécula. Por otro lado, el área de la señal es proporcional al número de núcleos que contribuyen a la resonancia y es por tanto, la base para el cálculo de la concentración de los metabolitos (Gribbestad y Midelfart, 1994).

A partir de la información contenida en el conjunto de datos, es posible establecer una relación entre el nivel de los metabolitos y la respuesta celular. La RMN ofrece un espectro que contiene señales de cientos de metabolitos que representan multitud de vías bioquímicas por lo que para facilitar el análisis éste se suele segmentar en pequeñas regiones.

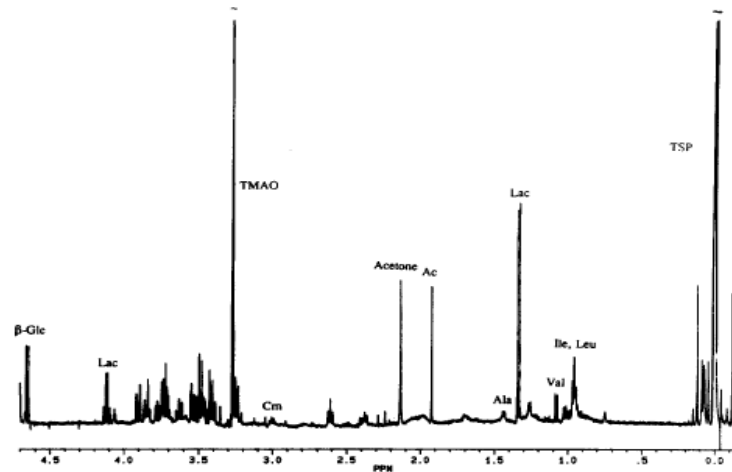


Figura 5. Espectro de ^1H correspondiente a muestras de HA de ojos de conejo donde se muestra la región alifática. Las abreviaturas pertenecen a los metabolitos identificados más representativos (Gribbestad y Midelfart, 1994).

La RMN es menos sensible que la EM u otras técnicas cromatográficas, ya que es difícil cuantificar sustancias a concentraciones inferiores a 0,1 mM; asimismo, puede ser difícil de interpretar cuando se solapan las señales de las distintas sustancias (Midelfart *et al.*, 1996c, Midelfart *et al.*, 1998). La EM se reserva para la detección y cuantificación de metabolitos específicos debido a su elevada sensibilidad, ya que detecta sustancias presentes en menor concentración (nanomolar o picomolar) (Midelfart, 2009).

La gran cantidad de datos que se obtienen del estudio metabolómico limita mucho la utilidad de las técnicas estadísticas tradicionales. El reconocimiento de patrones es el nombre común utilizado para identificar los métodos que organizan los datos de la metabolómica, con el fin de clasificar las muestras conocidas en clases y las desconocidas en una de las clases conocidas sobre la base de su patrón de medición (Jain *et al.*, 2000, Berrueta *et al.*, 2007). Se basa principalmente en procedimientos matemáticos y estadísticos como el análisis de componentes principales (PCA), el análisis discriminativo lineal, el análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) y el análisis por mínimos cuadrados parciales; que permiten analizar gran cantidad de información a partir de un número reducido de muestras en un tiempo relativamente corto (Duarte *et al.*, 2004).

Metabolómica en enfermedades oculares

La metabolómica se ha utilizado en numerosos modelos animales y en multitud de enfermedades. A nivel ocular son varios los estudios que se han venido realizando en los últimos años (Young y Wallace, 2009).

Ya en la década de los 80 Greiner *et al.* (1985), realizaron trabajos de investigación en los que emplearon la RMN del ^{31}P para analizar el metabolismo ocular en el HA y en el vítreo de ojos de cerdo.

Midelfart *et al.* (1996a y 1996b) analizaron por RMN los extractos de ácido perclórico de las córneas y lentes procedentes de conejos, observando una elevada expresión de taurina y glutatión, lo cual sugirió la existencia de un potente ambiente antioxidante en los tejidos oculares.

Se han realizado varios estudios acerca de los efectos que tiene la radiación ultravioleta A y B sobre la lente y el HA de ratas y conejos observándose interesantes variaciones en el perfil metabólico (Risa *et al.*, 2004, Tessem *et al.*, 2005).

En el vítreo procedente de pacientes con uveítis facolíticas y crónicas se ha detectado un perfil metabólico diferente que ayuda a comprender mejor la naturaleza inflamatoria de las dos condiciones (Young y Wallace, 2009).

Otro enfoque que permite el estudio del perfil metabólico del ojo de una manera no invasiva, es la combinación de la RMN de alta resolución y la imagen de resonancia magnética (Midelfart, 2009). Un ejemplo de ello es el estudio de Doganay *et al.* (2012), en el que se analizaron los cambios en los metabolitos presentes en el vítreo y el NGL de varios pacientes con glaucoma mediante estas técnicas. Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto un aumento significativo de los niveles de glutamato y de lactato en los pacientes con glaucoma con respecto al grupo control.

Todos estos estudios demuestran que la metabolómica puede ser muy útil en el análisis de enfermedades oculares como el glaucoma, la degeneración macular asociada a la edad o algunas condiciones infecciosas o inflamatorias en las que todavía hay mucho que investigar (Young y Wallace, 2009).

Metabolómica del humor acuoso

El estudio del HA se ha utilizado como una modalidad diagnóstica de numerosas enfermedades oftalmológicas en medicina humana (Hazel *et al.*, 1985). El análisis de los metabolitos y las sustancias que hay presentes en él puede ser muy útil para entender la patogenia de los procesos que suceden en el globo ocular. Puesto que el volumen del HA no suele ser superior a 0,2-0,3 ml, resulta complicado medir muchas sustancias mediante las técnicas convencionales (Brown *et al.*, 1986). Debido a que tiene una baja concentración de proteínas, se puede analizar directamente sin ser previamente procesado y se asume que los picos asignados a aminoácidos específicos proceden de aminoácidos libres y no de los péptidos o de las proteínas (Brown *et al.*, 1986, Srivatsa *et al.*, 1991, Gribbestad y Midelfart, 1994).

De la misma manera que otros fluidos corporales, la composición del HA experimenta variaciones especie específicas que se reflejan en los perfiles metabolómicos (Midelfart *et al.*, 1996c).

En el HA procedente de ojos de conejo se han encontrado 20 metabolitos principales: leucina, isoleucina, valina, lactato, alanina, lisina, acetona, glutamato, piruvato, succinato, citrato, taurina, betaína, mio-inositol, glucosa, AA, tirosina, histidina, fenilalanina y formato. La señal más dominante del espectro se correspondió con los protones del lactato (Gribbestad y Midelfart, 1994).

Son varios los estudios que se han realizado sobre la composición del HA obtenido de personas sometidas a cirugía de cataratas o de desprendimiento de retina. Entre todos los metabolitos destacan el lactato y la glucosa aunque se han identificado muchos más, como por ejemplo: glutamina, alanina, treonina, 3-hidroxi-butirato, citrato, creatinina y ascorbato (Brown *et al.*, 1986, Tkadlecova *et al.*, 1999).

Los estudios realizados con muestras de HA procedentes de ojos de bacalao han puesto de manifiesto la presencia de multitud de metabolitos entre los que se incluyen: glucosa, lactato, acetato, alanina, valina, histidina, fenilalanina, tirosina y creatinina (Midelfart *et al.*, 1996c). A diferencia de las personas y el conejo, este animal no presentó señal para el AA, reflejando el nivel de vitamina C de la dieta y los hábitos de alimentación de estos animales.

Por otro lado, la espectroscopia de RMN también se ha consolidado como una herramienta útil para la detección y caracterización de fármacos. Midelfart *et al.* (1998) demostraron la utilidad de esta técnica para evaluar la penetración de corticoides tópicos en el interior del globo ocular.

Asimismo, Song *et al.* (2011) investigaron la patogénesis del glaucoma inducido por la administración de corticoides estudiando el efecto de éstos sobre el metabolismo ocular.

Modelos de glaucoma

Los modelos experimentales han mejorado el conocimiento sobre el glaucoma y han permitido probar nuevos tratamientos antes de su utilización en las personas. Existen varios tipos de modelos: de cultivos celulares, de cultivos de órganos, de ojos post mórtem y de animales. Todos tienen ventajas e inconvenientes. Los modelos animales tienen como principal ventaja el hecho de que mantienen intacto el sistema visual y el organismo del animal, por tanto las respuestas fisiológicas son más similares a las que suceden en pacientes con glaucoma que aquellas observadas en los cultivos de células o de órganos. Su principal limitación es la falta de cooperación por parte de los animales y la necesidad de anestésicos para realizar los procedimientos (Weinreb y Lindsey, 2005).

Un modelo de glaucoma ideal debería ser fácil de hacer, barato, reproducible y tan similar al glaucoma en la especie humana como sea posible (Levkovitch-Verbin *et al.*, 2002, Weinreb y Lindsey, 2005, Johnson y Tomarev, 2010).

En la elección de la especie animal, se debe considerar: el tamaño del ojo, la similitud con el ojo humano, el coste y la disponibilidad (Tabla 1).

Tabla 1. Ventajas y limitaciones de los distintos modelos animales de glaucoma (Weinreb y Lindsey, 2005).

	Mono	Conejo	Rata	Ratón
Similitud general con el ojo humano	++++	++	++	++
Similitud en la dinámica de HA	++++	+	+++	++++
Elevación experimental de la PIO	+++	++	+++	+++
Elevación espontánea de la PIO	-	+	-	+++
Excavación del NO	++++	-	+++	+++
Secuencia genómica	-	-	-	+++
Disponibilidad de cepas transgénicas	-	-	+	++++
Bajo coste económico	-	+	+++	++++
Facilidad de mantenimiento y manejo	-	++	+++	+++
Facilidad para desarrollar las pruebas	+	+++	++	+

Se han documentado distintos modelos de glaucoma en el mono, el cerdo, el conejo, el perro y el ratón (Morgan *et al.*, 2000, Ruiz-Ederra *et al.*, 2005, Borghi *et al.*, 2010). Aunque los grandes mamíferos tienen más similitudes con el humano, su coste es elevado y tanto el mantenimiento como la manipulación no son sencillos. En cambio, los modelos basados en roedores aportan avances en el entendimiento sobre la fisiopatología del glaucoma gracias a que son fáciles de manipular experimentalmente, tienen un corto periodo de vida, un coste reducido y la estructura y funcionalidad ocular son similares a la especie humana (Cohan y Bohr, 2001, Johnson y Tomarev, 2010, Samsel *et al.*, 2011). Además, existe un amplio conocimiento sobre la biología de su SNC y de cómo los daños a nivel de la retina y de la cabeza del NO están relacionados con los aumentos de la PIO (Morrison, 2005).

Existen numerosas líneas de roedores, en las que el glaucoma sucede debido a una mutación genética que produce una alteración en la dinámica del HA o en la biología de las CGR (Bayer *et al.*, 2001c). La principal ventaja de trabajar con este tipo de líneas es que las respuestas que se obtienen en términos de incremento de la PIO, el daño en el NO y la retina son mucho más uniformes que las que se obtienen en los procedimientos quirúrgicos. Sin embargo, el tiempo necesario para alcanzar el glaucoma suele ser demasiado largo (9-15 meses) y no se puede modificar experimentalmente (Johnson y Tomarev, 2010).

En las personas, el aumento de la PIO constituye el principal factor de riesgo en el desarrollo del glaucoma. Por ello, la mayoría de los procedimientos experimentales van destinados a incrementarla hasta niveles que produzcan deterioro de las CGR sin producir daño en el resto de estructuras intraoculares (Stewart *et al.*, 2000, Levkovitch-Verbin *et al.*, 2002, Johnson y Tomarev, 2010). En la gran mayoría de modelos, uno de los dos ojos es manipulado mientras que el otro se mantiene intacto y se utiliza como control. Sin embargo, conviene destacar que se ha demostrado que los daños realizados en el ojo tratado pueden inducir cambios moleculares significativos en el contrario (Ramírez *et al.*, 2010).

Se señalan a continuación los modelos que han sido desarrollados hasta la actualidad para producir un incremento de la PIO en la rata, tanto de forma aguda como crónica. Es importante tener en cuenta que en las personas, el GPAA cursa con un aumento de PIO moderado que produce daño a nivel del NO a lo largo de muchos años. Por esta razón, los modelos animales deberían evitar alcanzar presiones excesivamente elevadas que pudieran alterar la naturaleza progresiva del daño (Morrison *et al.*, 2008).

Moore *et al.* (1993) describieron un modelo en el que se inyectaba una solución salina hipertónica en las venas colectoras del HA. La hipertonicidad de la solución altera las membranas celulares y produce un estrechamiento de la malla trabecular y el ángulo iridocorneal, consiguiendo una elevación de la PIO estable y moderada (Morrison, 2005, Morrison *et al.*, 2008). El inconveniente del modelo es que necesita material muy especializado y las inyecciones son técnicamente difíciles de realizar (Samsel *et al.*, 2011).

Shareef *et al.* (1995) desarrollaron un método consistente en la aplicación de cauterio sobre dos vasos episclerales con la intención de bloquear la salida del HA a través de los conductos colectores del canal de Schlemm. Este método es relativamente sencillo de hacer y mantiene el aumento de PIO durante más tiempo que el modelo descrito anteriormente. El inconveniente es que la salida del flujo de sangre del globo ocular está impedida por la oclusión de las venas que abandonan el ojo, por lo que la hipertensión puede deberse tanto a la congestión vascular como al bloqueo parcial de la salida del HA.

Ueda *et al.* (1998) ensayaron un modelo de glaucoma en el que aumentaban la PIO bloqueando la eliminación de HA mediante la fotocoagulación de la malla trabecular tras la inyección de tinta India en la cámara anterior. Con este modelo el daño se limita a la malla trabecular, pero necesita varias aplicaciones de láser para aumentar un 60% la PIO y genera sinequias periféricas anteriores que contribuyen al aumento de la presión (Mittag *et al.*, 2000).

En este mismo año, Laquis *et al.* (1998) utilizaron el modelo de oclusión venosa aunque en este caso, las CGR fueron teñidas mediante la aplicación de un colorante en el CS antes de la inducción del glaucoma. El principal inconveniente es que las células estuvieron sometidas a dos agresiones durante el experimento: la presencia de tinción en su interior y el aumento de la PIO (Mittag *et al.*, 2000).

Mittag *et al.* (2000) realizaron una modificación del método de Shareef *et al.* (1995), desarrollando un modelo en el que ocluyeron 3 venas episclerales por un tiempo más prolongado, entre 12 y 15 semanas. En este procedimiento, las CGR se tiñeron sólo al finalizar la fase de elevación de la presión para evitar el daño que pudieran sufrir derivado de la tinción.

Levkovitch-Verbin *et al.* (2002) desarrollaron otro modelo de glaucoma que consistió en coagular con láser la malla trabecular a través del limbo esclerocorneal. Este modelo produjo un aumento de la PIO en prácticamente todos los casos tratados, limitándose el daño a las CGR y al NO. Aunque el procedimiento fue fácil de llevar a cabo, tiene varios inconvenientes: las mediciones de presión se realizaron con los animales anestesiados, tras el tratamiento con láser se observaron algunas complicaciones oculares como el desarrollo de hifema y opacidades corneales y la PIO se redujo a su nivel normal a las tres semanas del procedimiento (Jia *et al.*, 2000b, Guo *et al.*, 2011).

Tras estudiar que la inyección de AH aumenta la PIO (Benozzi *et al.*, 2002), se desarrolló un modelo de glaucoma crónico basado en la inyección semanal de este producto en la cámara anterior durante un periodo de 10 semanas (Moreno *et al.*, 2005). En este modelo, se observó un descenso significativo de la actividad electroretinográfica en condiciones escotópicas y daño a nivel de las CGR y los axones del NO. Aporta varias ventajas sobre el resto: es barato y fácil de realizar, permite obtener una hipertensión consistente y elevada de larga duración y no impide la eliminación del HA, lo que favorece la realización de estudios farmacológicos.

Más recientemente, se han descrito métodos basados en la obstrucción de la malla trabecular mediante la inyección de microesferas (Úrcola *et al.*, 2006, Sappington *et al.*, 2010). Estos modelos tienen la ventaja de no necesitar un gran equipamiento y de poderse aplicar en varias especies con mínimas adaptaciones, pero tienen dos inconvenientes: las microesferas pueden ser difíciles de mantener en el ojo tras las inyecciones, lo cual hace que el control de la presión sea más difícil, y además, pueden desplazarse hacia la zona de la pupila dificultando el examen del fondo de ojo (Samsel *et al.*, 2011).

Yu *et al.* (2006) desarrollaron un modelo muy similar al de Shareef *et al.* (1995). En vez de cauterizar las venas episclerales, realizaron una ligadura de las mismas con una sutura de nylon

que fue colocada tras una pequeña incisión en conjuntiva y cápsula de Tenon. Con este procedimiento se consiguió un aumento moderado de la presión inmediatamente después de la cirugía que se mantuvo durante varios meses. El principal inconveniente de esta técnica es que puede existir reformación de vasos sanguíneos con el consiguiente descenso de la presión y la necesidad de repetir el procedimiento.

Samsel *et al.* (2011) desarrollaron un modelo experimental para inducir hipertensión usando una solución salina balanceada estéril que contenía microesferas ferro-magnéticas. Dichas microesferas se dirigen hacia el ángulo iridocorneal mediante un imán con la intención de producir una oclusión de la malla trabecular. Las principales ventajas de este método son que el fondo ocular puede examinarse sin problemas, ya que las microesferas no obstruyen la pupila y que se puede variar el número de inyecciones para modular la elevación de la PIO.

Este mismo año, Guo *et al.* (2011) combinaron la inyección de aceite de silicona en la cámara anterior junto con la electrocoagulación de los vasos del limbo esclerocorneal. Este modelo presenta la ventaja de que es barato, fácil de realizar y proporciona una hipertensión intraocular inmediatamente después del procedimiento que persiste durante seis meses. Además, los cambios patológicos y el descenso en el número de CGR son consistentes con los acontecidos en el glaucoma de las personas. Sin embargo, en este modelo se desconoce cuál de los dos procedimientos es el principal responsable del incremento de la presión. Asimismo, no se han realizado estudios de función retiniana como la ERG y es probable que el contacto de la silicona con la córnea a largo plazo pueda producir daño de la misma.

Kim *et al.* (2012), desarrollaron su modelo inyectando en la cámara anterior un carbómero compuesto al 0,3%. Estos autores demostraron el aumento de la PIO desde el primer o segundo día tras una sola inyección y confirmaron la lesión glaucomatosa evidenciando cambios histológicos a nivel del NO y las CGR. Como ventajas destacan la facilidad para realizar las inyecciones, el bajo coste del procedimiento y la elevación sostenida de la PIO que se consigue.

Biermann *et al.* (2012) combinaron los protocolos de fotocoagulación con láser anteriormente publicados con el estrechamiento temporal del ángulo iridocorneal mediante la paracentesis de la cámara anterior. Este modelo consiguió un aumento de la PIO durante 3 semanas y una disminución significativa del número de CGR. Tiene algunos inconvenientes: produce un aumento muy agudo de la PIO, que no sucede en el GPAA de las personas, otros factores como la inflamación o la isquemia pueden estar involucrados y en más de la mitad de los ojos tratados con láser se observó una opacidad corneal central.

Medición de la presión intraocular

La tonometría es la técnica que se utiliza para medir la PIO de forma indirecta (Ollivier *et al.*, 2007). Puesto que la elevación de la misma es un factor determinante en la progresión de la enfermedad glaucomatosa (Jia *et al.*, 2000a, Stewart *et al.*, 2000), los modelos de glaucoma crónico necesitan poder determinarla de una manera precisa, reproducible y no invasiva durante un largo periodo de tiempo (Moore *et al.*, 1996, Wang *et al.*, 2005, Saeki *et al.*, 2008). Sin embargo, medir la PIO en roedores (especialmente en el ratón) resulta complicado por el pequeño tamaño del globo ocular y su manejo (Goldblum *et al.*, 2002, Wang *et al.*, 2005).

Existen métodos invasivos que permiten conocer la PIO directamente mediante una cánula que se introduce en el interior del globo ocular y que es posteriormente conectada a un transductor. Este sistema, proporciona la presión intracamerular con mucha precisión pero no se puede hacer con el animal consciente ni repetir varias veces en el mismo ojo. Además, conlleva riesgo de inflamación o infección (Wang *et al.*, 2005, Saeki *et al.*, 2008).

Por otro lado, existen diferentes técnicas no invasivas para su determinación, pudiéndolas agrupar en tonometría de indentación, aplanamiento y rebote (Ollivier *et al.*, 2007).

Tonometría de indentación

El tonómetro de Schiötz, se desarrolló en 1905 y aunque se ha utilizado durante muchos años ya no se usa en medicina humana. El instrumento mide la cantidad de indentación corneal producida por un determinado peso. Este tonómetro, proporciona lecturas que deben ser convertidas mediante una tabla y para su utilización es necesario que el globo ocular del paciente se sitúe totalmente paralelo al suelo, por lo que en especies con los ojos lateralizados y pequeños, como es el caso de la rata, es necesaria la anestesia general (Ollivier *et al.*, 2007).

Tonometría de aplanamiento

Esta técnica (también conocida como tonometría de aplanación) aplica el principio de Imbert-Fick por el cual, la presión necesaria para aplanar 1 mm^2 de la córnea es igual a la presión que existe dentro del ojo. Hay muchos modelos: el de Perkins (Whitacre *et al.*, 1991, Shareef *et al.*, 1995), el neumotonógrafo, el tonómetro de Goldmann o el Tono-Pen son algunos ejemplos (Ollivier *et al.*, 2007).

El tonómetro de Goldmann o el de Perkins son instrumentos muy similares que estiman la PIO alineando sobre el globo ocular un prisma de contacto corneal que va conectado a un pequeño motor que calcula la fuerza de aplanamiento (Ollivier *et al.*, 2007). El de Perkins es un instrumento portátil que consigue mediciones muy fiables en las personas y el de Goldmann, uno de los más utilizados en medicina humana, va instalado en la lámpara de hendidura y está calibrado para que la PIO pueda ser leída en un dial graduado (Ollivier *et al.*, 2007, Ehrlich *et al.*, 2012).

Cohan y Bohr (2001) realizaron una modificación en el tonómetro de Goldmann para su uso en la rata consciente, comprobando que se trataba de un método fiable. Sin embargo observaron una disminución en los valores de la PIO conforme realizaban las medidas, fenómeno que ya fue documentado anteriormente por Goldmann en humanos.

Desde que se documentó por primera vez hace 17 años, el Tono-Pen es uno de los tonómetros de aplanamiento más utilizados en el campo de la veterinaria (Nagata *et al.*, 2011). Se han desarrollado varias versiones y aunque el Tono-Pen[®] 1 es fácil de utilizar porque registra más lecturas por minuto, la segunda generación de Tono-Pen (Tono-Pen[®] 2 o Tono-Pen[®] XL) proporciona cada una de las lecturas tomadas permitiendo al examinador ignorar las que considere como falsas (Mermoud *et al.*, 1994).

Se trata de un instrumento portátil (60 g), compacto (18 x 2 cm), de fácil calibración y que funciona con pilas (Moore *et al.*, 1996, Ollivier *et al.*, 2007). En la punta contiene un émbolo protegido por una membrana de látex cuyo retroceso tras el contacto con la córnea produce una señal que es amplificada y digitalizada. Antes de utilizarlo, se debe aplicar un colirio anestésico. Las medidas de PIO se visualizan en una pantalla y tras cuatro lecturas (indicadas por un breve pitido), se obtiene la media de las mismas (indicada por un tono algo más sostenido). La PIO media se expone con un coeficiente de varianza (5%, 10%, 20% y >20%), debiéndose aceptar como válidas las medidas con un error menor del 5% (Ollivier *et al.*, 2007). Dicho % es una medida estadística de la repetibilidad de las medidas pero no un reflejo de la precisión del aparato, de manera que un error constante en la técnica de medición podría producir una lectura de PIO errónea con una desviación estándar (DE) excelente (Morrison *et al.*, 2008).

En el estudio de Whitacre *et al.* (1991), donde se comparan varios tonómetros de indentación y aplanamiento, se determinó que el Tono-Pen producía un incremento de la PIO que asociaron al contacto manual del aparato con el ojo sin ningún soporte mecánico. Además, observaron que la fiabilidad de las mediciones dependía en gran medida de la experiencia del investigador, ya que los más inexpertos tendían a indentar la córnea más que los experimentados (Whitacre *et al.*, 1991, Goldblum *et al.*, 2002).

Moore *et al.* (1993) compararon la precisión del Tono-Pen frente a un transductor de presión calibrado. Este estudio, realizado con ojos de rata viva anestesiada, concluyó que se trata de un método fiable. Sin embargo, se detectó una infravaloración de la PIO a altas presiones y una sobrevaloración de la misma a bajas presiones, fenómeno que también se ha descrito en el perro, el gato y el ser humano (Mermoud *et al.*, 1994, Ollivier *et al.*, 2007).

El Tono-Pen[®] Avia tiene las mismas características que el Tono-Pen[®] XL pero no necesita calibración y es más ergonómico, facilitando su utilización en cualquier posición (Pereira *et al.*, 2011). Desde hace unos años, existe una versión veterinaria del Tono-Pen[®] XL llamada Tono-Pen[®] Vet (Leiva *et al.*, 2006).

Tonometría de rebote

También llamada de inducción/impactación, se basa en la emisión de una sonda metálica, cuya punta redondeada y plástica, impacta a gran velocidad contra la córnea. La deceleración de la sonda al contactar con el globo ocular se correlaciona con la PIO (Wang *et al.*, 2005). Existen muchos dispositivos que utilizan este sistema, el tonómetro ICare[®] o el IOPen[®] son dos ejemplos utilizados en medicina humana. En medicina veterinaria, el TonoVet[®] o el TonoLab[®] son los últimos dispositivos comercializados, siendo el último el primer tonómetro diseñado para medir la PIO en roedores (Saeki *et al.*, 2008). Estos tonómetros son pequeños, ligeros y portátiles, de manera que se pueden hacer varias mediciones sin ejercer demasiada presión sobre el globo ocular. Los valores de PIO no dependen del operario ya que éste presiona el botón que lanza la sonda sin tocar el ojo (Leiva *et al.*, 2006). Para su correcta utilización no necesitan anestesia tópica (Leiva *et al.*, 2006, Ollivier *et al.*, 2007, Saeki *et al.*, 2008).

Actualmente, los tonómetros más utilizados en los modelos de glaucoma realizados en roedores son el Tono-Pen y el TonoLab[®], siendo recomendable calibrarlos previamente (Morrison *et al.*, 2008).

Variables que afectan a la presión intraocular en la rata

Es importante considerar todos los factores que pueden afectar a la medición de la PIO; la presión arterial, el pulso, la respiración y la ansiedad pueden producir cambios en la fiabilidad de las mediciones (Wang *et al.*, 2005, Ollivier *et al.*, 2007).

Los valores de presión varían según la raza, la sedación y el método de determinación. En general, la contención excesiva, un posicionamiento inadecuado o la falta de experiencia en el uso de los equipos pueden aumentar la PIO. Para no obtener lecturas erróneas, se recomienda trabajar en ambientes tranquilos y realizar muchas sesiones con la finalidad de familiarizar a los animales con la sujeción y los procedimientos de medida (Whitacre *et al.*, 1991, Wang *et al.*, 2005).

Materiales y métodos

Caracterización funcional, estructural y molecular del modelo de glaucoma crónico experimental basado en la inyección intracamerular de ácido hialurónico en la rata

Modelo animal

Para llevar a cabo esta Tesis Doctoral se ha elegido la rata (*Rattus Norvegicus*) de la raza Wistar, perteneciente al orden *rodentia* y a la familia *muridae*.

Se utilizaron ratas macho con un peso promedio de 200 ± 40 g y 7 semanas de edad que se obtuvieron de los laboratorios Harlan[®] (Barcelona, España) y que fueron estabuladas en las instalaciones del animalario de la Unidad Central de Investigación (UCIM) de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia.

Tras un periodo de aclimatación (15 días) en el box de cuarentena (según indicaciones del RD 1201/2005) permanecieron en la sala de mantenimiento con ciclos controlados de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad a una temperatura de $22^{\circ}\text{C} \pm 2$, a una humedad relativa del $55\% \pm 10$, y con una impulsión de aire filtrado a través de filtros HEPA (*High Efficiency Particulate Absolute*) con más de 15 renovaciones de aire/hora.

La estabulación se llevó a cabo en jaulas de dimensiones adecuadas para la especie que permitieron el alojamiento de los animales en grupo, según la normativa vigente (Directiva 86/609 y RD 1201/2005), de manera segura y cómoda, favoreciendo los ajustes de postura y de comportamiento normales. Tuvieron libre acceso al agua y a una dieta estándar de mantenimiento fabricada y distribuida por los laboratorios Harlan[®] (Teklad lab animal diets, laboratorios Harlan[®], Barcelona, España) en forma de *pellet*.

Todo el protocolo de trabajo (manipulación y sacrificio de los animales) se realizó siguiendo las normativas internacionales de la ARVO (*Association for Research in Vision and Ophthalmology*) y fueron aceptadas por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia, siguiendo las normas referentes al bienestar y experimentación animal (RD 1201/2005 sobre “protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos”) y las recomendaciones de FELASA (*Federation for Laboratory Animal Science Associations*).

Diseño experimental

El estudio se planteó con dos grupos de animales:

1. **Grupo control:** formado por 5 ratas cuyos ojos intactos, derechos e izquierdos, fueron utilizados para estudiar los valores basales de PIO (n=5), la histología normal de la retina y el NO (n=3), la presencia de CGR apoptóticas en la retina normal (n=3), el conteo y la distribución de las CGR (n=1) y el perfil metabólico del HA (n=2).
2. **Grupo glaucoma experimental:** formado por 25 ratas a las que se inyectó semanalmente AH en la cámara anterior del ojo izquierdo (OS u ojo glaucoma) y suero salino fisiológico (SSF) en la cámara anterior del ojo derecho (OD u ojo control) durante un periodo de diez semanas (Benozzi *et al.*, 2002, Moreno *et al.*, 2005). En este grupo se desarrollaron los procedimientos que se relatan a continuación en dos

fases temporales separadas por un periodo de 6 meses. La primera fase se llevó a cabo con 10 animales y la segunda con 15.

- a. Procedimientos realizados semanalmente durante la fase de inducción del glaucoma:
 - i. Exploración ocular completa (n=25).
 - ii. Estudio de la evolución de la PIO (n=25).
 - iii. Estudio electroretinográfico (n=15).

- b. Procedimientos realizados al finalizar la fase de inducción de glaucoma:
 - i. Estudio del perfil metabólico del HA (n=15).
 - ii. Análisis histopatológico de la retina y el NO (n= 9).
 - iii. Estudio de la población de CGR:
 - i. Marcaje retrógrado con Fluorogold (n=5).
 - ii. Detección de células ganglionares mediante Brn3a (n=7).
 - iii. Detección de apoptosis en las CGR (n=9).

En una rata del grupo glaucoma experimental se produjo una parada cardiorrespiratoria en la semana 7 del experimento. Según se visualizó en la necropsia macroscópica, la muerte no estuvo relacionada con el modelo experimental, y fue atribuida a complicaciones durante la inducción anestésica.

Procedimientos realizados durante la fase de inducción del glaucoma crónico

La inducción del glaucoma crónico se realizó semanalmente durante 10 semanas en el grupo glaucoma experimental.

Pesaje

Se llevó a cabo semanalmente en una báscula de laboratorio digital para garantizar que no hubo pérdidas de peso que pudieran estar relacionadas con un empeoramiento del estado general.

Examen oftalmológico

La exploración oftalmológica completa bilateral se realizó siempre a la misma hora del día (9:00-11:00 a.m.), con la rata despierta, de forma ordenada y sistemática e incluyó:

Medición de la presión intraocular (mm Hg)

Se realizó mediante el tonómetro de aplanamiento (Tono-Pen® Vet, Medtronic, Madrid, España) previa instilación de colirio anestésico (Colircusí anestésico doble, laboratorios Alcon®, Barcelona, España). Para evitar las variaciones asociadas al estrés del manejo, tanto la sujeción de los animales como la toma de PIO fueron realizadas siempre por la misma persona. Las ratas conscientes, escogidas de manera aleatoria, eran sujetadas suavemente evitando ejercer presión en la zona del cuello o la cabeza. Tras escoger al azar el OD o el OS, se tomaron 15 lecturas en cada uno de ellos, obtenidas al contactar la punta del tonómetro con la córnea del animal (Figura 6). No se registraron las medidas generadas por el momento de la retirada del tonómetro ni por el funcionamiento normal del aparato.



Figura 6. Medición de la PIO con el Tono-Pen® Vet.

En todas las ratas del grupo control se registró la PIO basal y en tres de ellas, con la intención de evaluar el efecto del estrés del manejo, también se determinó la PIO de los dos ojos a los cinco minutos de la inducción anestésica con el protocolo que detallamos en el siguiente apartado.

En el grupo glaucoma experimental la PIO se registró semanalmente, antes de las inyecciones de SSF y de AH. Además se midieron las presiones a las 24 horas post-inyección en la semana 7ª y

a las 48 horas post-inyección en las semanas 0, 7^a, 8^a, 9^a y 10^a, con la intención de determinar un posible pico de PIO. En todos los animales, las presiones por debajo de 6 mm Hg fueron desechadas por proceder del contacto del aparato con la película lagrimal (Moore *et al.*, 1993).

Todos los datos de PIO fueron transferidos a una hoja de cálculo (Microsoft Office Excel, Microsoft Corporation, Redmond, Estados Unidos) para su posterior análisis.

Exploración de los anejos oculares y del segmento anterior

Con ayuda de la lámpara de hendidura Kowa SL-15[®] (Kowa Optimed, Inc. Torrance, EUA) se valoró, a 16 aumentos, el aspecto de los órganos anejos, la córnea, la cámara anterior y el cristalino; posteriormente, se evaluó la presencia de turbidez en la cámara anterior. Se utilizó la luz difusa (12 mm) y la hendidura de 0,8 mm, 0,2 mm y 0,1 mm a una intensidad de luz variable (1/4 o 1/16).

Anestesia

Una vez realizado el examen ocular las ratas fueron inducidas y mantenidas con anestesia inhalatoria mediante una máquina anestésica para roedores (Cibertec, Madrid, España). La inducción se realizó con Isoflurano (Isoflo[®], Laboratorios Esteve, Barcelona, España) en una cámara de gases al 5% y el mantenimiento mediante un circuito cerrado que se conectó a una mascarilla para ratas al 2,5% (Figura 7). El flujo de oxígeno se mantuvo a 1 litro por minuto.

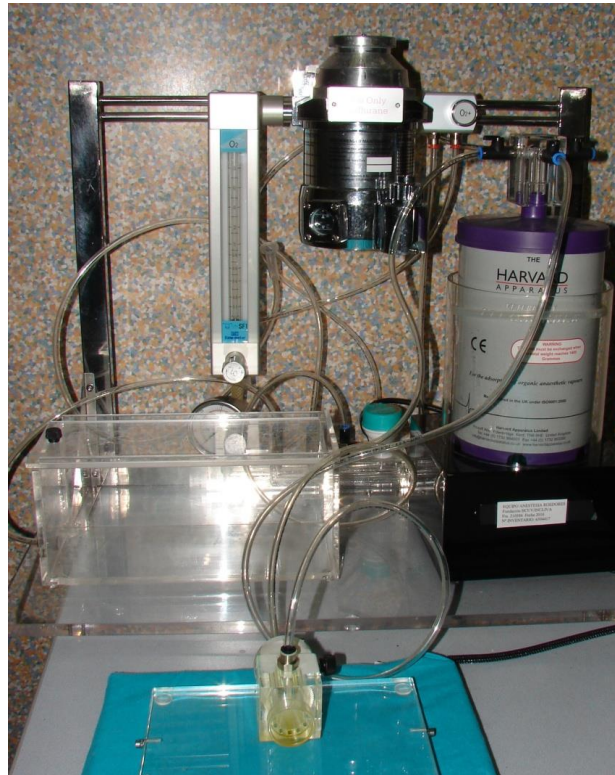


Figura 7. Máquina anestésica con cámara de inducción y máscara para roedores.

Inyección de suero salino fisiológico y ácido hialurónico en la cámara anterior

Tras lavar la superficie del globo ocular con povidona yodada diluida (1:50) con SSF y mediante una jeringa de Hamilton® (Hamilton® GASTIGHT® Syringes, 1700 Series, Luer tip, Sigma-Aldrich®, Madrid, España) y una aguja de 30G (Sterican®, B.Braun, Barcelona, España), se inyectó 25 µl de AH (Viscoelástico Z-Hyalin 10 mg/ml, Imex®, Valencia, España) en la cámara anterior del OS y la misma cantidad de SSF 0,9% (B.Braun, Barcelona, España) en el OD.

Este procedimiento se llevó a cabo con la ayuda del microscopio quirúrgico OMS-90 operator (Topcon, Barcelona, España). Con el bisel de la aguja hacia arriba y con la ayuda de las pinzas de córnea Colibrí (Acrivet, Henningsdorf, Alemania) se atravesó la córnea cerca del limbo esclerocorneal, con cuidado de no lacerar el iris, y se inyectó el SSF o el AH (Figura 8). Para evitar lesiones se empezó inyectando en la zona más dorsal del globo ocular (equivalente a las 12 horas) y se continuó semanalmente de hora en hora considerando el ojo como la circunferencia de un reloj. Una vez finalizado el procedimiento, todos los animales se trataron con una gota de cloranfenicol (®Colircusí Cloranfenicol, laboratorios Alcon®, Barcelona, España) dos veces al día durante una semana.



Figura 8. Inyección de AH en la cámara anterior del OS.

Estudio electroretinográfico

Los ERG escotópicos se realizaron en 15 ratas del grupo glaucoma experimental, antes de las inyecciones, a las 5, 7, 9 y 11 semanas; empezando siempre por el OD y tras 12 horas de adaptación a la oscuridad. Para poder trabajar con los animales se utilizó una linterna con un punto de luz roja (Advanced Headlight LED x6, Energizer®, Barcelona, España) que se apagó durante los registros. Todos los procedimientos se realizaron bajo anestesia, con el mismo protocolo descrito anteriormente, utilizando el electroretinógrafo Retiport (Acrivet, Henningsdorf, Alemania) adaptado para realizar los registros de cada ojo por separado.

Las ratas se situaron sobre una placa de calor para mantener la temperatura corporal entre 37°C y 38°C. La pupila se dilató previamente con Tropicamida al 1% (Colircusí Tropicamida 1%, laboratorios Alcon®, Barcelona, España). Para colocar el electrodo activo (Goldring electrode, Acrivet, Henningsdorf, Alemania) sobre la córnea se utilizó una gota de colirio anestésico y una gota de gel lubricante (Hycare 1% HA, Acrivet, Henningsdorf, Alemania), que facilitó el contacto del electrodo con la córnea y ayudó a evitar queratopatías por exposición. El electrodo de referencia se colocó en la piel de la frente y el electrodo base en la piel de la cola. El estimulador de luz blanca LED se situó a 2 centímetros del ojo (Figura 9 A y B). Para generar la respuesta escotópica de baja intensidad se estimuló la retina con 8 disparos de flash a 0,03 cd.s/m² y 0,3 Hz de frecuencia. Para obtener la respuesta escotópica estándar se estimuló la retina con 8 disparos de flash a 3 cd.s/m² y 0,3 Hz de frecuencia y para la adquisición de los PO se realizaron 5 disparos de flash a la intensidad de 3 cd.s/m² y 0,2 Hz de frecuencia. Todo el procedimiento se llevó a cabo en los 20 minutos posteriores a la inducción anestésica.

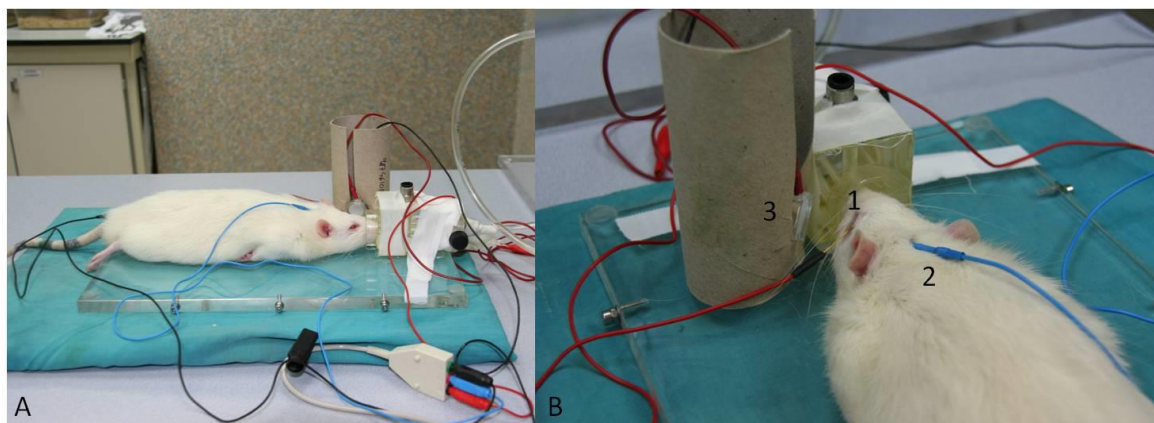


Figura 9. A: disposición de la rata y los electrodos tras la realización de un ERG. B: detalle del electrodo activo (1), el electrodo de referencia (2) y el estimulador de luz blanca LED acoplado al electrodo Koijman desconectado (3).

Se determinó la amplitud de la onda a y b (μV), la latencia de la onda a y b (ms), así como el sumatorio de las latencias (ms) y amplitudes (μV) de los PO. Los datos fueron transferidos a una hoja de cálculo para su posterior análisis.

Procedimientos realizados al finalizar la fase de inducción de glaucoma crónico

Estudio del perfil metabólico del humor acuoso

Antes de la eutanasia de los animales y con el mismo protocolo anestésico descrito anteriormente, en 15 ratas del grupo glaucoma experimental y 2 ratas del grupo control, se procedió a la extracción de 15 μl de HA para la obtención de su perfil metabólico por RMN. La centesis de la cámara anterior se llevó a cabo bajo el microscopio quirúrgico con ayuda de la jeringa de Hamilton® conectada a una aguja de 30G.

El material extraído se depositó en *ependorfs* rotulados de 1,5 ml (Alvet Plus S.L., Valencia, España) y se conservó a -80°C hasta su procesamiento por el servicio de metabolómica de la UCIM de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia.

El procedimiento general de preparación de las muestras consistió en adicionar 2,5 μL de D_2O al HA y trasvasar un volumen final de 15 μL a un tubo (Bruker Biospin, Rheinstetten, Alemania) de RMN de alta resolución de 1 mm de diámetro (Figura 10 A). En todos los casos, el tiempo de

preparación siempre fue inferior a 15 minutos. Todos los espectros fueron adquiridos en un espectrómetro Bruker Avance DRX 600 (Bruker Biospin GmbH, Rheinstetten, Alemania) (Figura 10 B) operando a una frecuencia de ^1H de 600,13 MHz. Inicialmente la uniformidad del campo magnético se consiguió mediante un ajuste manual de las bobinas de homogeneidad usando un experimento con presaturación de agua en modo interactivo. Con la primera muestra se establecieron las condiciones idóneas para la adquisición de la señal y para el resto, la homogeneidad de campo se mantuvo mediante una rutina de corrección automática (TopShim) implementada en el software del equipo. La temperatura nominal de la muestra durante las medidas se mantuvo constante en 310K. Para todas las muestras se adquirió un experimento de un pulso simple con presaturación de agua, con 256 repeticiones y 65.000 puntos. La presaturación del agua se usó durante 1 segundo a lo largo del tiempo de reciclado para la supresión de la señal del solvente. La anchura espectral para todos los espectros fue de 8000 Hz para el espectro de ^1H . Como parte del preprocesado de los datos, se aplicó una función exponencial de anchura de línea de 0,3 Hz a la señal obtenida. El desplazamiento químico de los picos se referenció a partir de la señal doblete de la molécula de glucosa a 5,245 ppm para todos los espectros.

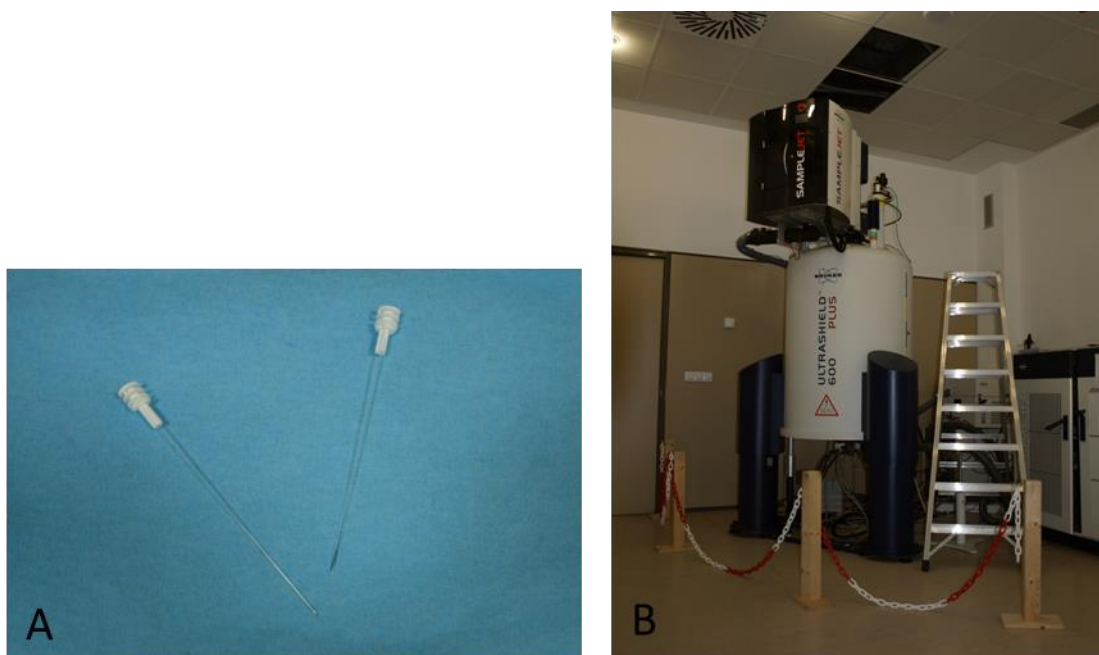


Figura 10. A: tubos de RMN de alta resolución de 1 mm de diámetro. B: espectrómetro Bruker Avance DRX 600 instalado en la Facultad de Medicina de Valencia (España).

Todos los espectros han sido procesados usando el programa MestReNova 6.2 (Mestrelab Research S.L., Santiago de Compostela, España), transferidos a MATLAB 7.6 R2008a (The

MathWorks Inc., Natick, Estados Unidos) y analizados usando rutinas de análisis de datos desarrolladas por el laboratorio de metabolómica en MATLAB y la librería de análisis estadístico multivariable PLS Toolbox (Eigenvector Research, Inc. Wenatchee, Estados Unidos).

La región de desplazamientos químicos en la que se ha trabajado estuvo comprendida entre 0,50 y 4,50 ppm (región alifática) y entre 5,20 y 10,00 ppm (región aromática). Para ciertas señales, la correcta asignación de cada pico a un metabolito resulta especialmente compleja. Esto puede ser consecuencia de la baja concentración del metabolito en la muestra y/o del alto grado de solapamiento de las señales. Para intentar mejorar la asignación de picos se emplearon secuencias especiales de asignación 2D (tipo TOCSY correlación ^1H - ^1H y HSQC correlación ^1H - ^{13}C) que son adquiridas para un grupo seleccionado de muestras. La asignación de los picos se realizó usando los datos presentes en publicaciones previas (Gribbestad y Midelfart, 1994, Midelfart *et al.*, 1996c, Midelfart *et al.*, 1998). Para eliminar las posibles diferencias entre concentraciones totales de metabolitos se normalizó al área total alifática.

Una vez construido el modelo discriminante se procedió a identificar las partes del espectro que contribuyeron con más peso al modelo (*loadings*) y los picos correspondientes en el espectro. Finalmente para los picos más significativos, según el modelo discriminatorio, se procedió a integrar el área bajo el pico y a asignar cada señal al metabolito al que podía corresponder.

Estudio histopatológico de la retina y el nervio óptico

Una semana después de terminar la inducción del glaucoma crónico se realizó la enucleación bilateral para el estudio histopatológico de la retina y el NO, en 9 ratas del grupo glaucoma experimental y 3 ratas del grupo control.

Previamente, con la intención de asegurar la correcta fijación de los tejidos, los animales se perfundieron en el Departamento de Anatomía y Embriología Humana de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia.

Técnica de perfusión

Las ratas fueron anestesiadas con una combinación intraperitoneal de 150 mg/Kg de pentobarbital (Euta-lender, Laboratorios Normon, S.A., Madrid, España) y 0,3 mg/kg de fentanilo (Fentanest[®], Kern Pharma, S.L., Barcelona, España). Todo el procedimiento que se relata a

continuación se realizó bajo una vitrina de gases (Burdinola OR ST 1500, Vizcaya, España) y tuvo una duración aproximada de 30 minutos.

Tras comprobar la ausencia de reflejos, incluyendo el del pinzamiento de la cola, se realizó una incisión en la piel y musculatura abdominal transversa a nivel medio. A continuación se revertió el hígado y se cortó el ligamento falciforme para despejar el centro frénico del diafragma, que se cortó transversalmente desde el ligamento arqueado de un lado hasta el otro. Posteriormente se realizaron dos cortes laterales de la caja costal en sentido craneal y se levantó la pared torácica; se introdujo la aguja de perfusión por el ventrículo izquierdo hasta alcanzar la aorta y se pinzó la aguja a nivel de la parte craneal del ventrículo con objeto de evitar el reflujo. Con la intención de no perfundir el tercio posterior del animal, se pinzaron la vena cava inferior y la arteria aorta descendente contra la columna torácica. Seguidamente se cortó la aurícula derecha y para comprobar el correcto funcionamiento de la perfusión se disecó y seccionó la vena yugular derecha. Con el objetivo de dejar sin sangre la circulación mayor y limpiar el árbol circulatorio, se inyectaron de forma lenta 250 ml de SSF heparinizado (B.Braun, Barcelona, España); una vez se apreció la salida de líquido claro por la vena yugular externa se inyectaron aproximadamente 500 ml de paraformaldehído al 4% en tampón fosfato (PB) (0,1 M, pH 7,4). En este paso se producen movimientos tónicos de la cabeza del animal que indican que el paraformaldehído ha llegado hasta el SNC.

Obtención de los globos oculares y de los nervios ópticos

Se realizó una enucleación transconjuntival convencional, seccionando el NO retrobulbar en el segmento anexo a la base de la órbita.

Cada globo ocular junto con el NO se mantuvo en la misma solución de formaldehído, utilizada en la perfusión, durante 24 horas en una nevera a 4°C. Posteriormente, se lavaron con tampón fosfato salino (PBS) 4 veces cada 10 minutos, para conservarlos en el mismo tampón hasta su procesamiento.

Procesamiento de los ojos y del nervio óptico

Tras la fijación, se realizó un corte a nivel del limbo esclerocorneal para separar el segmento anterior del posterior. El NO se separó a 1 mm de la copa óptica de forma que se incluyeron las dos estructuras por separado en el mismo casete (Uni-Safe Embedding-Cassettes, Medim Histotechnologie, Stensved, Dinamarca). Para diferenciar el extremo del NO más próximo al globo

ocular, se utilizó una sutura de vicryl 5/0 (Ethicon, Madrid, España) que identificó el segmento más distal.

Las muestras se sometieron a baños en agitación con diversas soluciones de alcoholes crecientes y bencenos para su posterior impregnación en parafina con el procesador de tejidos STP-120 Spin Tissue Processor (Microm Laborgerate S.L., Barcelona, España).

Realización de los cortes

Todas las muestras fueron incluidas, correctamente orientadas y por separado, en bloques de parafina mediante el empleo de una estación de parafina (Oxford Trade, Madrid, España).

Mediante un microtomo pfm Rotary 3003 (pfm medical, Köln, Alemania) se realizaron 6 cortes transversales de 5 μm de grosor por cada bloque.

Los cortes fueron posteriormente recogidos en un baño de agua caliente con un portaobjetos (PolysineTM, Menzel-Gläser[®], Braunschweig, Alemania) para su posterior tinción con Hematoxilina-Eosina (Merck, Madrid, España).

Estudio histológico de la retina y del nervio óptico

La valoración microscópica de la retina y el NO de cada rata se realizó con un microscopio óptico de alta resolución (Nikon Eclipse E600, Nikon[®], Barcelona, España) conectado a una cámara (Nikon Digital Camera DXM 1200, Nikon[®], Barcelona, España) que capturó las imágenes a través del software Automatic Camera Tamer (ACT-1 2.70) (Nikon Instruments Inc, Amsterdam, Holanda).

La morfometría de la retina se evaluó como describió Takahata *et al.* (2003) con algunas modificaciones. Por cada ojo se fotografiaron tres campos de 40x y por cada campo se evaluaron tres zonas: los dos extremos y la parte central. En todas ellas se midieron, mediante el sistema analizador de imágenes microscópicas NIS-Elements 2.3 (Nikon Instruments Inc, Amsterdam, Holanda) el espesor (μm) de la CCG + CFN, de la MPI, de la CNI, de la MPE y de la capa de fotorreceptores (CNE+SEF) así como el espesor total de la retina. Además se realizó la identificación morfológica de las células de la CCG, distinguiendo los perfiles celulares compatibles con la morfología de las CGR y las células amacrinas desplazadas. El número de células presentes en la CCG + CFN se calculó mediante densidad celular lineal (células por 100 μm). A la

magnificación utilizada cada píxel de la imagen corresponde a 0,24 μm . Finalmente tanto los espesores como la densidad celular se expresaron como el promedio de 9 medidas.

El área de la sección transversal del NO (μm^2) se evaluó tal y como describieron Levkovitch-Verbin *et al.* (2002). Mediante el mismo sistema analizador de imágenes microscópicas se delimitó el borde externo del NO a la magnificación de 10x-20x (dependiendo del tamaño del corte). Por cada ojo se utilizó el promedio de 3 áreas de medida. A la magnificación de 10x y 20x cada píxel de la imagen corresponde a 0,95 μm y 0,48 μm respectivamente.

Todos los datos fueron transferidos a una hoja de cálculo para su posterior análisis.

Estudio de la población de células ganglionares de la retina

Para identificar, cuantificar y estudiar con más exactitud y precisión la distribución de la población total de CGR tras la inducción del glaucoma crónico, se combinó el estudio histopatológico con los procedimientos que detallamos a continuación. Todos ellos fueron realizados mediante un convenio de colaboración entre el Laboratorio de Oftalmología Experimental del Departamento de Oftalmología, Optometría, Otorrinolaringología y Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina de Murcia, según métodos previamente establecidos por Vidal-Sanz *et al.* (2012), y la Unidad de Investigación Oftalmológica “Santiago Grisolia” del Hospital Universitario Dr. Peset a través de la Red Temática de Investigación Colaborativa en Oftalmología (OftaRed) del Instituto de Salud Carlos III (Madrid).

Para ello ocho ratas (7 del grupo glaucoma experimental y 1 del grupo control), escogidas al azar, fueron transportadas de forma homologada al animalario de la Facultad de Medicina de Murcia, al finalizar la fase de inducción del glaucoma crónico. Con la intención de preservar la corteza cerebral para futuras investigaciones, el marcaje con FG se realizó solamente en seis de las ratas, de nuevo escogidas al azar, mientras que la inmunodetección con Brn3a se realizó en todas ellas (n=8). Estos procedimientos se realizaron tras una semana de aclimatación.

Marcaje retrógrado con fluorogold

Tras la administración intraperitoneal de 70 mg/Kg de ketamina (Ketolar®, Parke-Davies S.L., Barcelona, España) y 10 mg/Kg de xilacina (Rompun®, Bayer S.A., Barcelona, España) se rasuró el pelo que cubre la parte dorsal de la cabeza y el cuello y se realizó una incisión sagital de la piel para exponer el cráneo. Con la ayuda de un microscopio quirúrgico (Opmi-11, Zeiss, Barcelona,

España) y mediante una fresadora (Free Wheeler Cordless Moto-Tool 850, Dremel®, Breda, Holanda) se efectuó una craneotomía parietal bilateral evitando las suturas craneales frontal, sagital y transversa. Tras retirar las meninges que cubren el cerebro, se succionó la porción de encéfalo e hipocampo necesaria para exponer bilateralmente la parte posterior del tálamo y los CS. Esto se realizó con la ayuda de una micropipeta conectada a un sistema de aspirado acoplado a una bomba de vacío (Ordisi S.A., Barcelona, España). Con unas pinzas de microcirugía se retiró la piamadre que recubre al CS derecho e izquierdo y se aplicó sobre ellos un pequeño trozo de esponja de gelatina absorbente y hemostática (Espogostan® Film, Nycomed, Madrid, España) previamente empapada en FG (Fluorochrome, LLC, Colorado, EUA) diluido al 3% en dimetilsulfóxido al 10% disuelto en SSF al 0,9%.

Por último, se cubrió la craneotomía con otro nuevo parche de esponja y se suturó la piel con una sutura discontinua de seda 3/0 (Lorca Marín, Murcia, España).

Una semana después del marcaje, todos los animales fueron sacrificados mediante perfusión-fijación siguiendo el mismo protocolo descrito anteriormente.

Procesamiento y obtención de las retinas

Para el estudio correcto de la distribución de las CGR es necesaria una buena orientación de la retina y por tanto del globo ocular, por lo que antes de la perfusión se colocó una sutura en la conjuntiva bulbar dorsal y se tomaron como puntos de referencia adicionales la inserción del músculo recto dorsal y la carúncula nasal.

Tras la enucleación se realizó la postfijación de los tejidos manteniendo los globos oculares durante una hora y media en paraformaldehído al 4% en PB (0,1 M, pH 7,2-7,4). Posteriormente, se conservaron en PBS (0,1 M, pH 7,2-7,4) a 4°C hasta la extracción y procesamiento de la retina.

En primer lugar se realizó un corte a nivel del limbo esclerocorneal y se separaron las estructuras del segmento anterior de la copa óptica. Seguidamente se realizaron cuatro cortes (superior, inferior, nasal y temporal) de los cuales el corte más profundo fue el superior. La retina se separó de la *ora serrata* con una pinza y de su unión al NO con unas tijeras; se extendió con la cara vítrea hacia arriba sobre un portaobjetos y se cubrió posteriormente con papel de filtro (Whatman®, Maidstone, Inglaterra). Durante la disección del globo ocular se realizaron varios lavados con PBS y a continuación se postfijó la retina con una solución de paraformaldehído al 4% durante una hora. Finalmente se quitó el papel de filtro y tras tres lavados con PBS se depositó sobre un portaobjetos y se limpió el vítreo y los restos de suciedad adherida con un pincel.

Para el montaje a plano las retinas se cubrieron con el medio de montaje *antifading* (glicerol al 50% y p-fenilendiamina al 0,04% en tampón carbonato sódico 0,1 M pH 9) para evitar la pérdida de fluorescencia. En último lugar se cubrió la muestra con un cubreobjetos (Deckglasser 24x50 mm, Menzel-Gläser®, Braunschweig, Alemania) y se selló con esmalte de uñas transparente.

Detección de las células ganglionares mediante Brn3a

Para la inmunodetección de las CGR, en primer lugar se permeabilizaron las membranas plasmáticas de las mismas mediante varios lavados en Tritón® X-100 0,5% en PBS (2 lavados de 10 minutos a temperatura ambiente) y posteriormente se congelaron a -70°C durante 15 minutos en este mismo tampón. Transcurrido este tiempo se realizó un lavado con PBS y se incubó con el anticuerpo primario de cabra anti-Brn3a (Goat anti-Brn3a C-20, Santa Cruz Biotechnologies, Heidelberg, Alemania) diluido 1:100 en solución bloqueante de suero normal de burro diluido en Tritón® X-100 al 2% en PBS para el bloqueo de las uniones inespecíficas. Tras la incubación a 4°C toda la noche con el anticuerpo primario, se lavaron las retinas en Tritón® X-100 0,5% en PBS (3 lavados de 10 minutos a temperatura ambiente), y para la detección del anticuerpo primario se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas con el anticuerpo secundario acoplado al fluoróforo Alexa Fluor 568 (Donkey anti-goat, Alexa Fluor® 568, Molecular Probes®, Invitrogen™, Barcelona, España) diluido 1:500 en tampón bloqueante. Posteriormente se lavaron las muestras en PBS (3 lavados de 10 minutos a temperatura ambiente) donde se mantuvieron hasta su montaje.

Adquisición de las imágenes de la retina

La valoración microscópica de las retinas montadas a plano se realizó mediante el microscopio de fluorescencia Axioscop 2 Plus (Zeiss, Mikroskopie, Jena, Alemania) equipado con tres filtros: el ultravioleta (BP 365/12, LP 397) que permite la observación de la fluorescencia blanca dorada del FG; el de rodamina (BP 546/12, LP 590) que permite visualizar la fluorescencia naranja roja de los anticuerpos conjugados con el fluoróforo Alexa Fluor 568 y el de fluoresceína, que permite la visualización de otros fluoróforos que no son objeto del estudio.

Las imágenes de cada área de captura individual (área de la retina donde se adquiere una imagen) se capturaron con una cámara digital de alta resolución (Progres C10®, Jenoptik, Jena, Alemania) conectada al microscopio y con la ayuda de una platina motorizada, movida por ordenador (ProScan™ H128 Series, Prior Scientific Instruments, Cambridge, Reino Unido),

conectada al programa de análisis de imágenes Image-Pro® Plus (IPP 5.1 para Windows®, Media Cybernetics, Silver Spring, MD, Estados Unidos) y a un módulo controlador del microscopio (Scope-Pro® 5.0 para Windows®, Media Cybernetics, Silver Spring, MD, Estados Unidos).

El área total de captura que cubre la retina entera está formada por una matriz de “m” por “n” áreas de captura individuales (con una superficie de $0,627 \text{ mm}^2$), columnas y filas respectivamente. Tras enfocar manualmente con el objetivo de 10x (Plan-Neofluar 10x/0,30, Zeiss Mikroskopie, Jena, Alemania) se capturó las imágenes individuales contiguamente y sin que hubiera superposición entre ellas siguiendo un patrón de escaneo regular. Posteriormente se guardaron en imágenes de color de 24 bits.

Para obtener el fotomontaje de la retina completa, se utilizó el programa de análisis de imágenes Image-Pro® Plus mediante el cual cada imagen individual digital se combinó automáticamente dando lugar a una imagen de la retina completa de alta resolución (Salinas-Navarro, 2011).

Contaje automático de las células ganglionares de la retina

Para calcular el número total y exacto de CGR trazadas retrógradamente con FG (CGR-FG⁺) o marcadas con Brn3a (CGR-Brn3a⁺) se siguieron las subrutinas de contaje automático, para cada tipo de marcaje, desarrolladas por el Laboratorio de Oftalmología Experimental del Departamento de Oftalmología, Optometría, Otorrinolaringología y Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina de Murcia. Para ello se utilizó el lenguaje de macros del programa de análisis de imágenes Image-Pro® Plus (Nadal-Nicolás *et al.*, 2009, Salinas-Navarro *et al.*, 2009), el cual lanza ordenadamente una secuencia de filtros y transformaciones sobre cada imagen digital individual que permiten la cuantificación de las CGR que hay en cada una de las 154 imágenes que forman la retina.

El contaje celular fue un procedimiento a ciegas, es decir en ningún momento se conocía cuál era el ojo glaucoma y el control.

Para las CGR-FG⁺ se transformaron las imágenes en color a una escala de grises de 8 bits que permitió descartar la información del color. Las aberraciones de iluminación causadas por la óptica del microscopio se corrigieron con el filtro de mejora del aplanado y los pequeños artefactos y el ruido se quitaron mediante tres pasos del filtro de mejora de la mediana. Después se aumentaron los bordes de las células utilizando el filtro espectro grande, que resalta las células teñidas de fluorescencia brillantes del fondo oscuro. Los grupos de células cuyos bordes estaban

en contacto fueron apartados por el filtro de separación, que en primer lugar erosionó los bordes de las células hasta que se alejaron y luego los volvió a dilatar pero sin que llegaran a tocarse. Finalmente las células de cada imagen fueron contadas excluyendo los objetos más grandes que $300 \mu\text{m}^2$ o más pequeños que $7 \mu\text{m}^2$ (parámetros que corresponden al objeto más grande o más pequeño marcado retrógradamente e identificado como CGR).

Para la detección de las CGR-Brn3a⁺ la imagen individual digital se procesó usando el filtro HiGauss que resalta los núcleos positivos. Posteriormente se aplicó el filtro LoPass que normaliza las variaciones de fondo y luego el filtro HiPass. Los núcleos de cada imagen fueron contados utilizando unos parámetros que ayudaron a excluir aquellos objetos que por su tamaño no pudieron ser núcleos de CGR-Brn3a⁺.

Los datos de todas las imágenes fueron transferidos a una hoja de cálculo para su posterior análisis.

Distribución espacial de las células ganglionares de la retina

El estudio de la distribución detallada de las CGR se realizó mediante los mapas de isodensidad para lo cual, como se ha comentado anteriormente, es importante orientar correctamente la retina para no obtener datos erróneos.

Para las CGR-FG⁺ se dividió cada imagen individual en áreas de interés (ADI), áreas de igual tamaño en las que se divide cada imagen individual (64 para el caso de la rata). En cada ADI, mediante la subrutina de contaje descrita previamente, se obtuvo el número de CGR-FG⁺ y automáticamente se calculó la densidad. Los valores de las densidades de todas las ADI de la retina se exportaron a una hoja de cálculo y utilizando la opción “gráfico trazado de contornos rellenos” del programa para hacer gráficos SigmaplotTM 9.0 para Windows[®] (Systat[®] Software, Inc, Chicago, Estados Unidos) se construyeron mapas de isodensidad coloreados. Para ello, a cada una de las 64 ADI de cada imagen se le asignó un color según el valor de la densidad de CGR; el rango de valores estuvo comprendido entre 0 (azul oscuro) y 3.500 o más CGR/mm² (rojo) (Figura 11 A).

Para las CGR-Brn3a⁺ se realizó el mismo procedimiento pero se utilizó la subrutina de contaje de núcleos marcados con Brn3a (Figura 11 B).

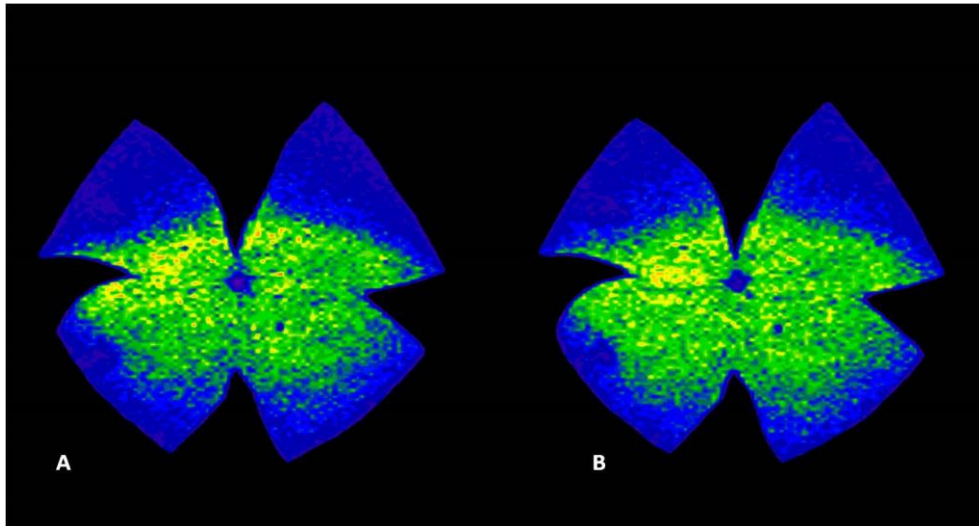


Figura 11. A y B: mapa de isodensidad correspondiente al fotomontaje de una retina representativa derecha mostrando las CGR-FG⁺ y las CGR-Brn3a⁺ respectivamente. A cada una de las 64 ADI en las que se divide cada imagen individual se le asigna un color según el valor de la densidad de CGR, en una escala de colores de 28 pasos diferentes, con un rango de valores que va desde 0 (azul oscuro) a 3.500 o más CGR/mm² (rojo).

Detección de apoptosis en las células ganglionares de la retina: técnica TUNEL

La detección de células apoptóticas mediante técnicas inmunofluorescentes se realizó en 9 ratas del grupo glaucoma experimental y 3 ratas del grupo control, utilizando secciones de retina de 5 μm conservadas en parafina.

Tras el desparafinado de las muestras, se utilizaron varios kits comerciales, atendiendo a las instrucciones del fabricante, en diferentes laboratorios: el TACS.XL[®] Basic *in situ* apoptosis detection Kit (Trevigen, Gaithersburg, Maryland, EUA) se utilizó en el Laboratorio de la Unidad de Investigación Oftalmológica “Santiago Grisolia” del Hospital Universitario Dr. Peset; el *In situ* cell detection kit (Roche, Madrid, España) se utilizó en el Laboratorio del Departamento de Fisiología de la Universidad CEU Cardenal Herrera y el ApopTag Fluorescein *In Situ* Apoptosis Detection (Chemicon, California, EUA) se utilizó en el Laboratorio de Neurobiología del Sistema Visual del Departamento de Fisiología, Genética y Microbiología de la Universidad de Alicante mediante el convenio de colaboración con la Unidad de Investigación Oftalmológica “Santiago Grisolia” del Hospital Universitario Dr. Peset a través de la OftaRed del Instituto de Salud Carlos III (Madrid). Posteriormente se visualizaron las muestras mediante microscopía de fluorescencia.

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos obtenidos fue realizado con el programa SPSS Statistics® v.17.0 para el sistema operativo Windows (Chicago, EUA).

En todas las pruebas realizadas hemos utilizado un nivel de significación del 95% y antes de proceder al análisis estadístico verificamos la homocedasticidad (test de Levene) de los datos y su normalidad (test de Kolmogorov-Smirnoff, método gráfico P-P).

Estudio de la presión intraocular

Para la variable continua de PIO estudiamos la media, la DE y el valor mínimo y el máximo para cada ojo: el control y el glaucoma. Para comparar los resultados de las diferencias entre los dos ojos utilizamos el test de Student para datos no independientes (apareados). La comparación de PIO entre las ratas despiertas y anestesiadas se realizó mediante el test de Student para datos independientes.

Estudio electroretinográfico

Para las variables continuas de amplitud y latencia de las ondas a, b y de los PO, estudiamos la media, la DE y el valor mínimo y el máximo para el OD y el OS.

Para comparar los resultados de las diferencias entre los dos ojos utilizamos el test de Student para datos apareados y para evaluar las diferencias entre cada ojo y el tiempo utilizamos un método de análisis de varianza de una vía no paramétrico (test de Kruskal-Wallis). Subsiguientemente analizamos las diferencias presentes en los distintos tiempos mediante el test de Mann-Whitney. Puesto que realizamos comparaciones múltiples, aplicamos a los resultados obtenidos con el test anterior la corrección de Bonferroni.

Estudio del perfil metabólico del humor acuoso

El perfil metabólico del HA se analizó mediante un PCA con la intención de agudizar la separación entre los grupos experimentales y de identificar qué variables contribuyeron más a esa diferenciación. La determinación de la significación estadística entre las medias de las integrales de pico de los grupos se realizó mediante el análisis de una vía de la varianza (ANOVA).

Cuando se observó que la separación entre grupos no se produjo de una forma directa y sencilla, se procedió a realizar un análisis discriminante supervisado, conocido como PLS-DA. El modelo PLS-DA fue evaluado mediante una validación cruzada empleando un método de réplicas aleatorias (*leave-one-out*).

Estudio histopatológico de la retina y el nervio óptico

La valoración histológica de la retina y el NO incluyó el estudio de la media, la DE y el valor mínimo y máximo de las siguientes variables: número de CGR/100 μm , espesor de las capas de la retina (CCG + CFN, MPI, CNI, MPE y capa de fotorreceptores (CNE+SEF)), espesor total de la retina y área del NO. Para comparar los resultados de las diferencias entre los dos ojos utilizamos el test de Student para datos no apareados.

Estudio de la población de células ganglionares de la retina

Para el análisis de las CGR-Brn3a⁺ estudiamos la media, la DE y el valor mínimo y el máximo para el OD y el OS. Para comparar los resultados de las diferencias entre los dos ojos utilizamos el test de Wilcoxon para datos apareados.

Resultados y discusión

Caracterización funcional, estructural y molecular del modelo de glaucoma crónico experimental basado en la inyección intracamerular de ácido hialurónico en la rata

Modelo experimental

Los roedores, y la rata en particular, son un modelo experimental de gran utilidad en investigación oftalmológica ya que poseen un ojo de pequeño tamaño, las patologías oculares son relativamente fáciles de reproducir, son económicos y de mantenimiento sencillo (Pinazo-Durán *et al.*, 1993, Pinazo-Durán, 2002, Vecino, 2008).

El modelo de glaucoma crónico desarrollado en esta Tesis es el descrito por Moreno *et al.* (2005). Éste a su vez se basa en las investigaciones de Benozzi *et al.* (2002) sobre los efectos del AH inyectado en la cámara anterior de la rata Wistar. Se trata de un modelo barato y que permite obtener una hipertensión consistente y elevada de larga duración; por otra parte no impide la eliminación del HA, lo que favorece la realización de estudios con fármacos que modifican la formación o la eliminación del mismo.

Los viscoelásticos que contienen AH se han convertido en una herramienta esencial para la cirugía del segmento anterior. Generan un espacio imprescindible para poder trabajar dentro del ojo y reducen el traumatismo que reciben las estructuras intraoculares así como la pérdida de células endoteliales. Sin embargo, debido su densidad, son responsables del aumento, transitorio pero a veces considerable, de la PIO en el postoperatorio inmediato cuando no son retirados correctamente (Benozzi *et al.*, 2002).

Las punciones de la cámara anterior resultaron un procedimiento sencillo y fácil de realizar tanto en el OS en el que se inyectó viscoelástico, como en el OD en el que se inyectó SSF. Fueron bien toleradas por todos los animales aunque con incidencias que se describen en el siguiente apartado.

Hallazgos clínicos durante el modelo experimental de glaucoma crónico

Evolución del peso

El peso medio inicial fue de $364,7 \pm 28,8$ g y en el momento del sacrificio fue de $426,8 \pm 42,3$ g (Figura 12). En general, todos los animales ganaron peso semanalmente durante la fase experimental. Este hecho es uno de los indicadores de bienestar animal y por tanto refleja de forma indirecta la ausencia de dolor o malestar que pudieran estar asociados a las punciones del globo ocular o a las complicaciones derivadas de las mismas.

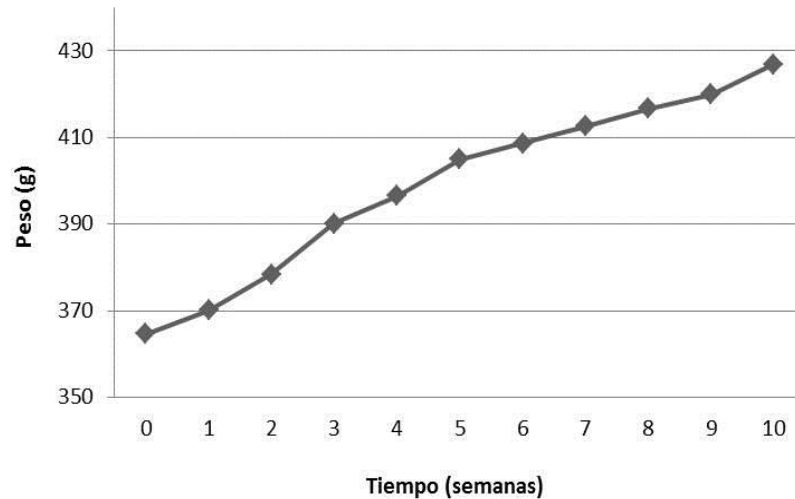


Figura 12. Evolución del peso medio de las ratas durante las 10 semanas del procedimiento experimental.

Hallazgos oftalmológicos e incidencias durante el modelo experimental

La exploración oftalmológica se llevó a cabo en todos los animales antes de la punción. Inicialmente se planteó el examen del fondo ocular con una lente de 92D. Sin embargo, fue prácticamente imposible de realizar con la rata despierta y sin dilatación pupilar. Hubiera sido muy interesante describir clínicamente las posibles lesiones asociadas de forma característica al glaucoma, como son la excavación de la cabeza del NO o los cambios a nivel de la papila (Distelhorst y Hughes, 2003).

Durante las diez semanas del modelo no observamos ninguna alteración a nivel de los órganos anejos del globo ocular (Figura 13), ni la presencia de blefarospasmo, epífora o fotofobia que pudieran indicar dolor o malestar.



Figura 13. Aspecto normal de los órganos anejos en la semana 5 del experimento.

En la siguiente figura se muestran los hallazgos encontrados en el segmento anterior durante las 10 semanas de la fase experimental; describimos a continuación los de mayor prevalencia (Figura 14).

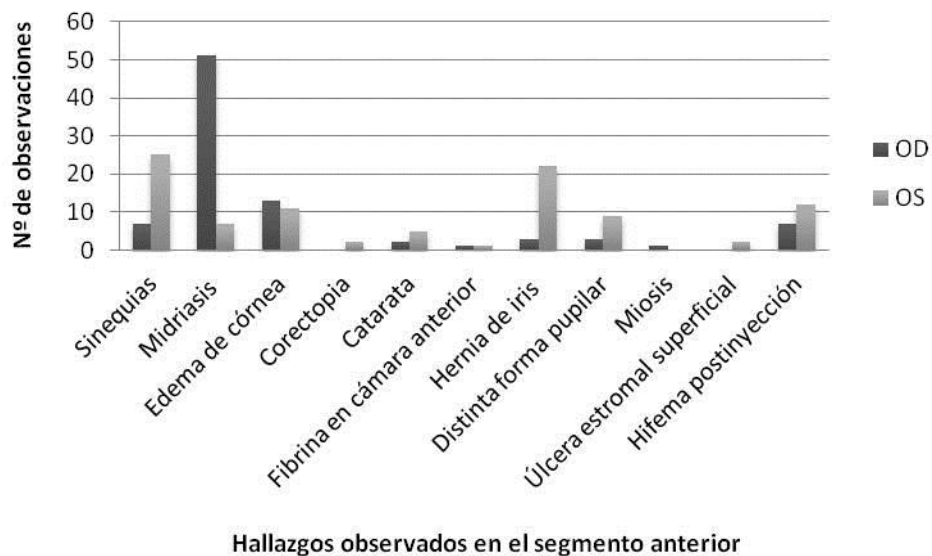


Figura 14. Hallazgos oftalmológicos en el OD y el OS a lo largo del modelo experimental.

Hemos observado hallazgos evidentes, como son la presencia de midriasis, sinequias y hernias de iris, que no han sido documentados en los modelos en los que hemos basado nuestro estudio (Benozzi *et al.*, 2002, Moreno *et al.*, 2005).

La presencia de midriasis leve en el ojo inyectado con SSF (Figura 15 A) fue documentada 51 veces en distintas semanas del experimento. El tamaño de la pupila varía en función del equilibrio que existe entre los músculos esfínter y dilatador del iris. El primero es responsable de la miosis pupilar y está controlado por el sistema parasimpático. El segundo es responsable de la midriasis y está mediado por el sistema simpático. Algunos estímulos que pueden producir midriasis al actuar sobre el sistema nervioso simpático son el dolor, la asfixia o la ansiedad (Gum *et al.*, 2007). Este hallazgo no fue constante a lo largo del experimento (Figura 15 B), asimismo el grado de dilatación pupilar fue variable, por lo que consideramos que pudo estar relacionado con el estrés de la sujeción y el manejo. Dado que estos factores también pueden afectar a los valores de PIO (Wang *et al.*, 2005, Ollivier *et al.*, 2007) algunos autores consideran conveniente realizar una fase de entrenamiento para que los animales se acostumbren a la sujeción, la instilación del colirio anestésico, el contacto del tonómetro con el ojo y el sonido de las señales de alerta del aparato (Sappington *et al.*, 2010). Por otro lado también hubiera sido interesante valorar objetivamente el diámetro pupilar, tal y como han realizado otros autores (Artigas *et al.*, 2012).

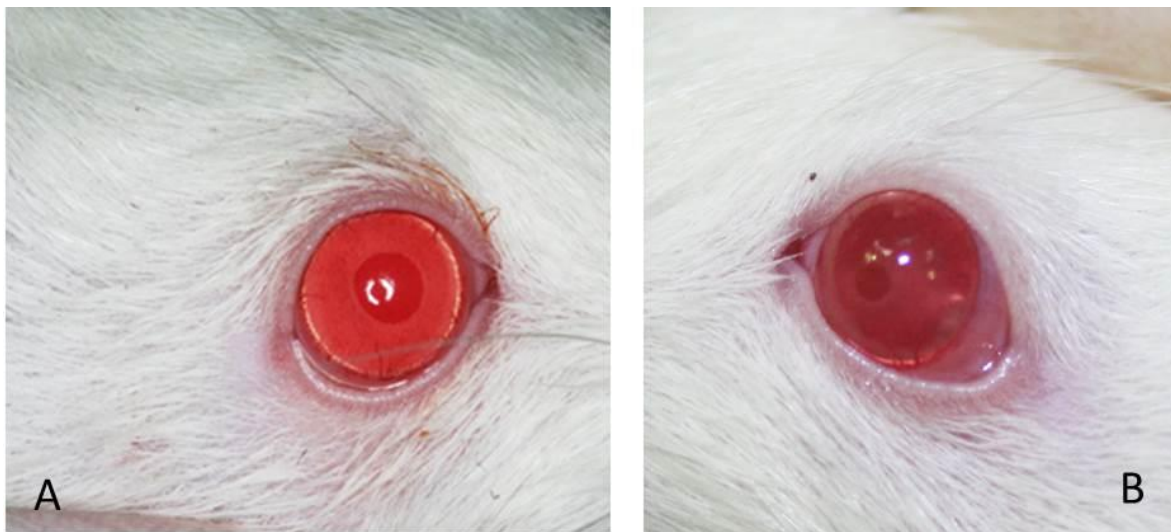


Figura 15. A: midriasis leve en el OD de una rata en la semana 6 del experimento. B: miosis pupilar observada en el OS de un animal diferente en la misma semana del experimento.

En el OS sin embargo, sólo observamos la presencia de midriasis en 7 ocasiones; atribuimos esta diferencia a la presencia de sinequias, documentada mayoritariamente en este ojo. Las sinequias son adherencias del iris a la córnea (anteriores) o al cristalino (posteriores) (Hendrix, 2007). En nuestro caso, todas fueron anteriores (Figura 16) y estuvieron asociadas al momento de la punción, debido al aumento inmediato de la presión en la cámara anterior tras la inyección del viscoelástico o el SSF, que producía la salida a presión de parte del material inyectado junto con el

iris. Esto mismo originó la aparición de 22 hernias de iris en el OS que asociamos a que el viscoelástico (mucho más denso que el SSF) produce un aumento de volumen de la cámara anterior mayor y más duradero en el tiempo en comparación con la inyección de suero, que tan sólo produjo esta complicación en 3 ocasiones. La mayoría de hernias tuvieron un tamaño reducido y desaparecieron a los pocos días sin signos de malestar ocular. Sólo en la rata 8 se produjo una hernia de iris de tamaño superior al resto que tardó más tiempo en desaparecer. Asociado a las hernias de iris, en 2 OS la pupila adoptó una posición errática y desplazada ventralmente (Figura 17).

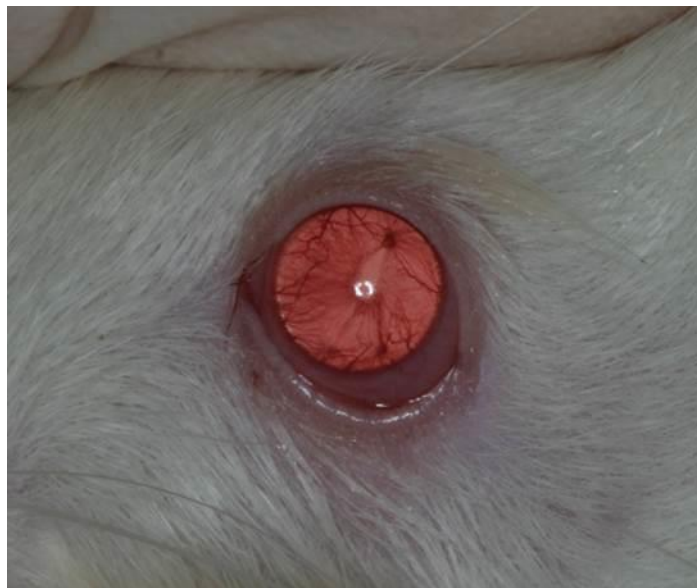


Figura 16. Sinequia anterior dorsal presente en el OS en la semana 3 del experimento.

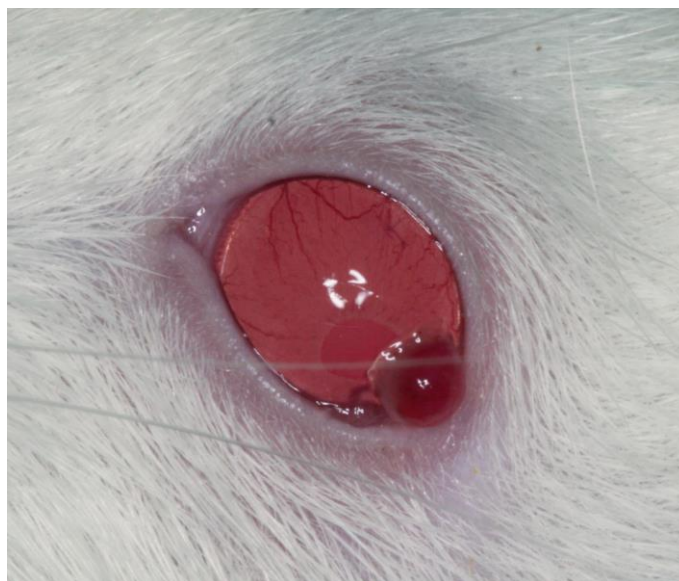


Figura 17. Hernia de iris ventral con desplazamiento ventral de la pupila en la semana 5 del experimento.

En 19 punciones (7 en el OD y 12 en el OS) se produjo un hifema que se resolvió en pocos días, no encontrando evidencias del sangrado a la semana siguiente en ninguno de los ojos. El contacto de la aguja con los vasos del iris o del limbo esclerocorneal fue el responsable de esta complicación.

En 13 OD y 11 OS observamos un leve edema de córnea (Figura 18) que, en todos los casos, se asoció al punto de inyección. Este hecho también fue documentado por Benozzi *et al.* (2002) y por Moreno *et al.* (2005), en casi todos los ojos de sus experimentos.

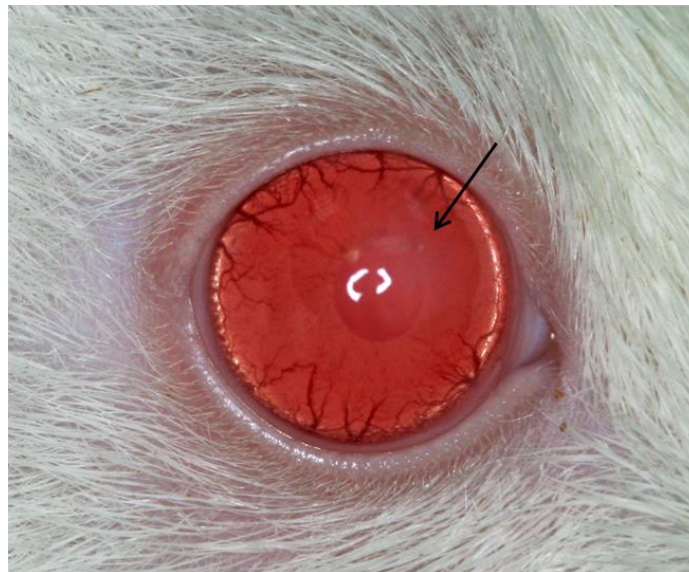


Figura 18. Edema de córnea dorsal en el OD en la semana 5 del experimento.

En 7 ratas (28%) documentamos una catarata capsular anterior de pequeño tamaño (2 en el OD y 5 en el OS) (Figura 19). Este hecho fue descrito en un porcentaje inferior por Benozzi *et al.* (2002) (12,5%) y Moreno *et al.* (2005) (6,25%) y pensamos que puede estar asociado al contacto de la aguja con la lente durante la punción.



Figura 19. Catarata capsular anterior y hernia de iris dorsal lateral en el OS en la semana 7 del experimento.

En 2 OS, la última semana del procedimiento experimental observamos una úlcera estromal superficial central que asociamos a una causa traumática. La lesión cicatrizó sin complicaciones en pocos días, no observándose signos de ulceración una semana después.

Evolución temporal de la PIO durante el modelo experimental de glaucoma crónico

A continuación relacionamos los datos sobre la PIO recogidos con el Tono-Pen® Vet durante la fase de inducción del glaucoma.

La PIO (media \pm DE) de las ratas del grupo control fue de $17,6 \pm 5,6$ mm Hg (n=10 ojos). Este valor es muy similar al de las ratas del grupo glaucoma experimental en la semana 0 del experimento, que fue de $17,6 \pm 2,16$ mm Hg (n=30 ojos). Ambos resultados se asemejan al descrito por Mermoud *et al.* (1994) que obtuvieron una PIO normal corregida medida con el Tono-Pen® 2 de $16,98 \pm 5,17$ mm Hg en la raza Lewis anestesiada con CO₂. Sin embargo son bastante superiores al obtenido por Benozzi *et al.* (2002), que describieron una PIO basal en la raza Wistar de $12,2 \pm 0,4$ mm Hg utilizando el Tono-Pen® XL. El estudio de Moreno *et al.* (2005), en el que hemos basado nuestro modelo experimental, no aporta ningún valor de PIO basal.

El tonómetro utilizado en este modelo ha sido el Tono-Pen® Vet, previamente calibrado. Este aparato se ha utilizado con éxito en el perro, el gato, el caballo, el mono, el conejo y algunas aves, obteniendo medidas de PIO muy fiables sin mucha dificultad (Yu *et al.*, 2009, Nagata *et al.*, 2011, Pereira *et al.*, 2011). En nuestro conocimiento, no existe en la literatura ningún trabajo sobre la PIO en la rata medida con el Tono-Pen® Vet. Todas las mediciones se han realizado por la misma persona con amplia experiencia en el manejo y utilización del aparato.

Al igual que en los humanos, la PIO está sujeta a variaciones circadianas. Por ello todas las medidas fueron tomadas a la misma hora del día (09:00-11:00 a.m.). Los animales estabulados con ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, presentan un leve aumento de la PIO en la fase de oscuridad con respecto a la luminosa. Dicho aumento seguramente está relacionado con un aumento en la producción de HA y con una limitada capacidad para la evacuación del mismo debido al pequeño tamaño del globo ocular (Moore *et al.*, 1996, Morrison *et al.*, 2008). Este fenómeno se hizo patente en el estudio de Jia *et al.* (2000b) donde en algunos casos, los aumentos de PIO sólo se demostraron en la fase nocturna.

En la siguiente Figura mostramos los valores medios de PIO para el OD y el OS (n=25) registrados cada semana antes de la inyección intraocular.

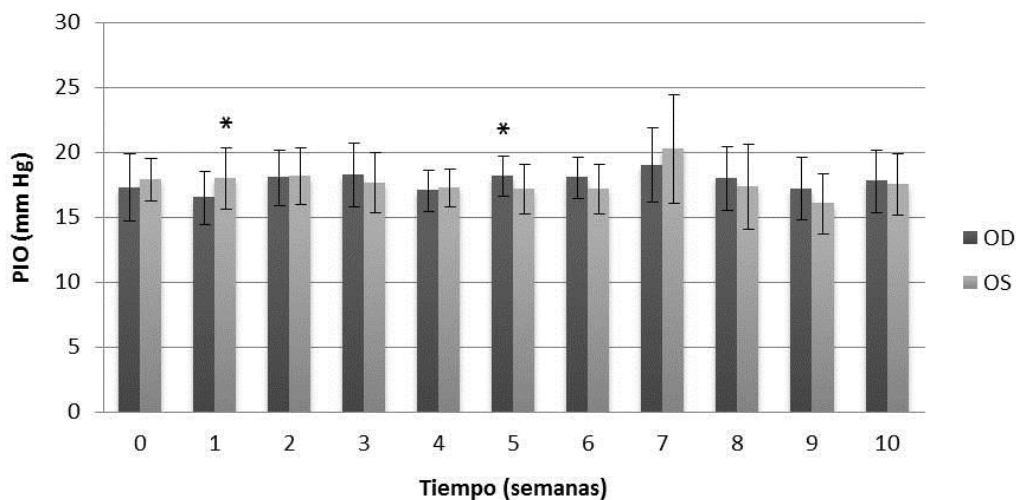


Figura 20. Valores de PIO, tomados con el Tono-Pen® Vet para el OD y el OS cada semana del experimento. Los datos se expresan como media \pm DE (* $p < 0,05$).

Como se puede observar, sólo detectamos un incremento significativo de PIO en el OS en la primera semana; en el OD, a diferencia de lo que cabría esperar, observamos un incremento significativo de PIO con respecto al OS en la semana 5ª.

Hemos basado nuestro modelo de glaucoma en el de Moreno *et al.* (2005), que evaluaron los efectos de la inyección semanal de AH durante 10 semanas. Estos autores encontraron en todos los ojos tratados (n=20) un valor de PIO superior al de los ojos control; asimismo observaron un incremento significativo de la PIO en el ojo inyectado con AH en las semanas 3ª, 6ª y 10ª. No hemos podido demostrar clínicamente el aumento progresivo y constante de la PIO en el ojo glaucoma que documentaron los autores que describieron este modelo; de hecho, prácticamente no existieron diferencias significativas entre los dos ojos a lo largo de nuestro experimento.

La bibliografía confirma que los resultados de PIO varían dependiendo del tipo de tonómetro. El Tono-Pen se ha utilizado previamente para medir la PIO tanto en la rata anestesiada como en la rata despierta y se ha considerado como un método de medición válido en esta especie (Moore *et al.*, 1993, Moore *et al.*, 1996, Jia *et al.*, 2000b, Jia *et al.*, 2000a, Benozzi *et al.*, 2002, Goldblum *et al.*, 2002, Moreno *et al.*, 2005). Moore *et al.* (1993) afirmaron que es posible calibrarlo para tomar lecturas fiables en la rata anestesiada y posteriormente muchos investigadores lo han utilizado, incluso sin aplicar fórmulas de corrección o calibraciones (Moore *et al.*, 1996, Jia *et al.*, 2000b, Jia *et al.*, 2000a, Bayer *et al.*, 2001b, Benozzi *et al.*, 2002, Moreno *et al.*, 2005). El correcto uso de este aparato depende de muchos factores. Es necesaria una buena iluminación y que la punta del aparato contacte perpendicularmente y en su totalidad con la córnea. Las medidas deben tomarse mediante un golpe rápido y estable que no ejerza demasiada presión y es importante discriminar los valores válidos de los inválidos. En nuestra opinión, los resultados obtenidos con el Tono-Pen® Vet han sido difíciles de interpretar, ya que han variado considerablemente para un mismo individuo y un mismo momento durante todas las semanas que ha durado el experimento.

Hemos registrado 15 lecturas en cada ojo para garantizar una mayor precisión en la medida, tal y como recomendaron Moore *et al.* (1993). Según varios autores, el contacto repetido de la punta del aparato con la córnea puede afectar a los valores de PIO además de que implica un mayor consumo de tiempo (Whitacre *et al.*, 1991, Cohan y Bohr, 2001, Goldblum *et al.*, 2002). Una hipótesis que no se ha podido demostrar sugiere que las sucesivas mediciones favorezcan la eliminación del HA a través de las vías de drenaje y que el adelgazamiento de la córnea que se produce tras las mismas puede ser el responsable del descenso de la PIO (Cohan y Bohr, 2001).

El Tono-Pen fue originalmente diseñado para medir la PIO en el ojo del ser humano, que tiene una mayor curvatura corneal. Hemos comprobado que la punta del aparato es demasiado grande para el ojo de la rata, por lo que puede ser menos preciso en estos animales, coincidiendo con otros autores (Goldblum *et al.*, 2002, Morrison *et al.*, 2008, Saeki *et al.*, 2008).

La rata despierta ha sido un animal dócil y fácil de manipular a lo largo del experimento, por lo que no resultó necesaria la anestesia para realizar la exploración ocular. Sin embargo, el estrés de la sujeción y el manejo también puede haber influido en la medición de la PIO (Whitacre *et al.*, 1991, Wang *et al.*, 2005). En nuestro conocimiento, no existen estudios que evalúen el efecto del entrenamiento de los animales, y por lo tanto la disminución del estrés, sobre la PIO. Aunque hay investigadores que realizan las medidas de presión en la rata dormida, otros recomiendan evitar el uso de anestésicos siempre que sea posible, ya que en general disminuyen significativamente la PIO (Jia *et al.*, 2000b). Estos autores demostraron que el isoflurano y la mezcla de ketamina, xilazina y acepromacina, producen un descenso significativo de la PIO y concluyen que la ketamina es el fármaco de elección en los casos en los que no se pueda evitar el uso de anestésicos para tomar la PIO. Adicionalmente, el uso de anestésicos aumenta la DE de las medidas, debido a la variabilidad que hay en la respuesta que producen en los animales. En 3 ratas del grupo control, determinamos la PIO de los dos ojos a los cinco minutos de la anestesia con isoflurano. En contra de lo que cabría esperar, no observamos diferencias estadísticamente significativas entre los valores de la rata despierta ($18,38 \pm 1,24$ mm Hg) y anestesiada ($17,22 \pm 1,72$ mm Hg), hecho que atribuimos a la poca precisión del tonómetro de aplanamiento que hemos utilizado.

Por otra parte la midriasis, en menor medida, también puede estar relacionada con la variabilidad de los valores de PIO. Cuando la pupila se dilata se produce un estrechamiento del ángulo iridocorneal y un aumento temporal de la PIO (Herring, 2007). Es muy probable, pues, que la midriasis (documentada 51 veces en el OD y tan solo 7 veces en el OS a lo largo del experimento) haya reducido las diferencias entre las medidas de ambos ojos.

Entre los distintos tonómetros de rebote, el TonoLab® está específicamente diseñado para roedores. Ofrece lecturas de PIO bien relacionadas con la presión intracameral manométrica dada por un transductor, siendo más precisas que las del Tono-Pen. Se puede utilizar tanto en la rata como en el ratón consciente y no necesita aplicar factores de corrección para obtener los valores de presión, ya que está diseñado exclusivamente para esta especie. La fuerza ejercida por el tonómetro al impactar con la córnea repetidas veces no parece afectar a las mediciones, pues no se ha observado ningún descenso de la PIO incluso después de 90 lecturas realizadas en pocos minutos, asimismo, no necesita anestesia tópica, es fácil de utilizar y no requiere mucha práctica para aprender a manejarlo (Wang *et al.*, 2005). En el estudio de Goldblum *et al.* (2002) se comparó la fiabilidad del Tono-Pen para medir la PIO en ratas anestesiadas con un prototipo de tonómetro de rebote adaptado por Kontiola *et al.* (2001). Estos autores concluyeron que la DE de todas las medidas mostró cinco veces menos variabilidad con el segundo aparato que con el

primero en el rango de presiones de 8,9-20 mm Hg. Estos datos coinciden con otro estudio posteriormente publicado en el conejo en el que se comparó el tonómetro de aplanamiento Tono-Pen® Avia con el tonómetro de rebote TonoVet® (Pereira *et al.*, 2011). Sin embargo otros estudios concluyen que no hay diferencias significativas en la precisión de los dos aparatos en los rangos normotensos de PIO (10-25 mm Hg) aunque el tonómetro de aplanamiento fue menos preciso que el de rebote (Nagata *et al.*, 2011).

A pesar de que no era un objetivo inicial en nuestro estudio, realizamos una toma de PIO a las 24 horas post-inyección en la semana 7ª y a las 48 horas post-inyección en las semanas 0, 5ª, 7ª, 8ª, 9ª y 10ª, para observar el posible incremento de PIO inmediatamente después de la administración intracameral de AH. Los resultados encontrados son muy contradictorios, ya que en el OS se produjo un descenso significativo de PIO a las 24 horas en la semana 7ª y a las 48 horas en la semana 8ª del experimento (Figuras 21 y 22).

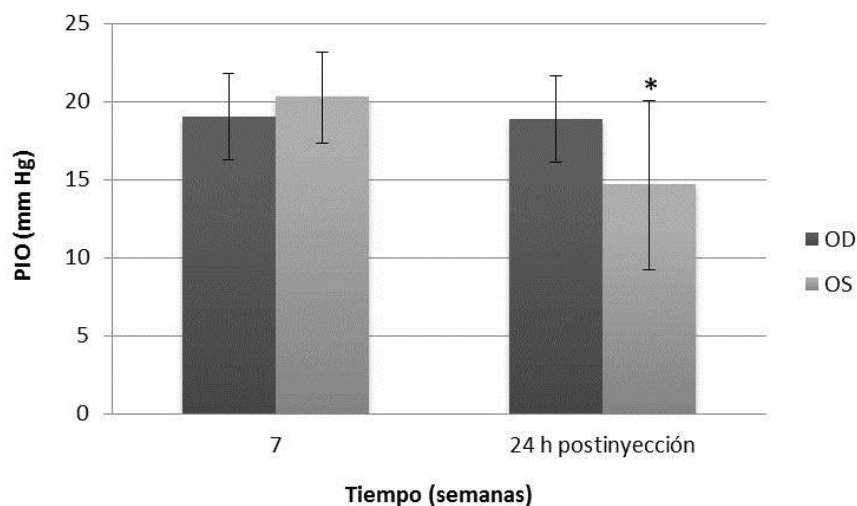


Figura 21. Valores de PIO, tomados con el Tono-Pen® Vet para el OD y el OS en la semana 7 del experimento y 24 horas después. Los datos se expresan como media \pm DE (* $p < 0,05$).

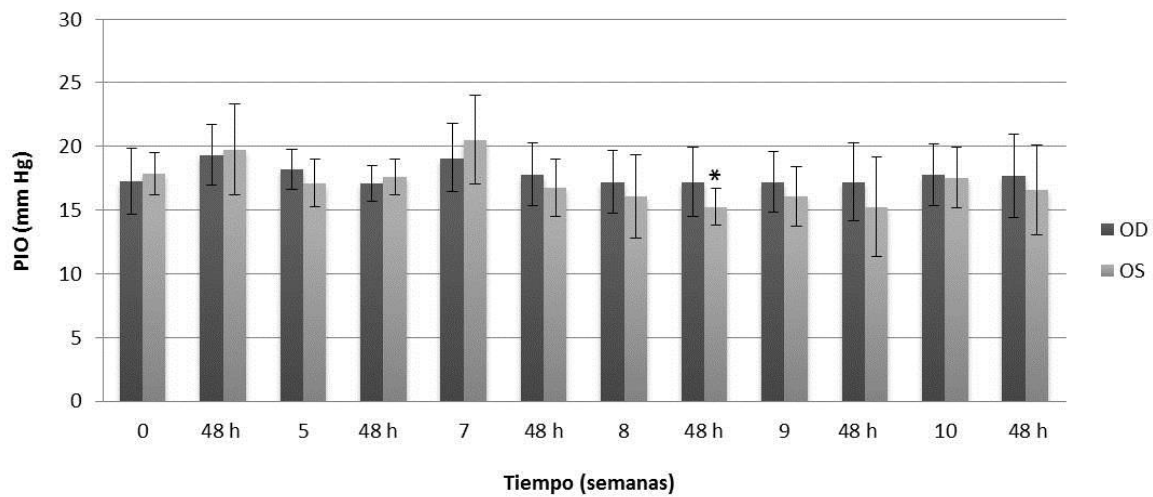


Figura 22. Valores de PIO, tomados con el Tono-Pen® Vet para el OD y el OS en la semana 0, 5, 7, 8, 9 y 10 del experimento y 48 horas después. Los datos se expresan como media \pm DE (* $p < 0,05$).

Estos resultados contrastan con los obtenidos por Benozzi *et al.* (2002) que comprobaron con el mismo modelo de glaucoma que a las 24 horas post-inyección en el ojo inyectado con AH se produjo un incremento de la PIO que casi alcanzó el doble del obtenido con el SSF en el ojo control; dicho aumento se mantuvo durante 5 días y fue descendiendo levemente hasta el día 8 post-inyección.

Valoración de los cambios electrorretinográficos asociados al glaucoma crónico

Con la intención de evaluar los cambios funcionales que sucedieron en las distintas capas de la retina, realizamos ERG escotópicos en 15 ratas del grupo glaucoma experimental antes de comenzar el experimento y a las 5, 7, 9 y 11 semanas.

El aparato Retiport fue adaptado para su uso en la rata mediante un electrodo corneal activo específico de roedores (Goldring electrode, Acrivet, Henningsdorf, Alemania) y un estimulador de luz blanca situado siempre a la misma distancia (2 cm del ojo). Para estandarizar la técnica y comprobar la validez del aparato, en las 15 ratas anestesiadas realizamos dos estudios electrorretinográficos previos antes de comenzar la fase experimental (datos no publicados). Aunque algunos autores recomiendan el uso de un fotoestimulador binocular (*Ganzfeld*), hemos

utilizado un estimulador que permitió la distribución de la luz de manera constante y uniforme hacia la retina en cada ojo por separado (Rosolen *et al.*, 2005).

Es difícil realizar comparaciones de nuestros resultados con otros estudios, ya que los datos dependen de muchos factores, como son la distancia del estímulo de luz, la estimulación mono o binocular, el protocolo utilizado o las horas de adaptación a la oscuridad, entre otros (Rosolen *et al.*, 2005). En nuestro conocimiento no existe en la literatura ningún trabajo de investigación sobre la actividad eléctrica de la retina de la rata realizado con el Retiport.

En la siguiente Tabla se muestran los valores basales (media \pm DE) de la amplitud y latencia de las ondas a y b y los PO (n=30).

Tabla 2. Valores basales de amplitud y latencia de la onda a y b (a altas y bajas intensidades de flash) y de los PO (a altas intensidades de flash).

Intensidad de flash (cd.s/m ²)	Amplitud (μ V)			Latencia (ms)		
	a	b	PO	a	b	PO
0,03	11,60 \pm 9,47	69,10 \pm 24,29		16,43 \pm 6,88	53,87 \pm 5,85	
3	51,28 \pm 20,46	181,77 \pm 55,51	31,9 \pm 12,80	18,50 \pm 1,55	31,50 \pm 1,83	22,2 \pm 1,3

Los valores se expresan como media \pm DE.

Los ERG registrados antes de comenzar el experimento no mostraron diferencias significativas entre el OD y el OS en ninguno de los parámetros evaluados (amplitud y latencia de la onda a, b y PO) a bajas intensidades de flash (0,03 cd.s/m²) y altas intensidades de flash (3 cd.s/m²). En la Figura 23 se muestra un ERG representativo del OD y el OS al inicio de la fase experimental.

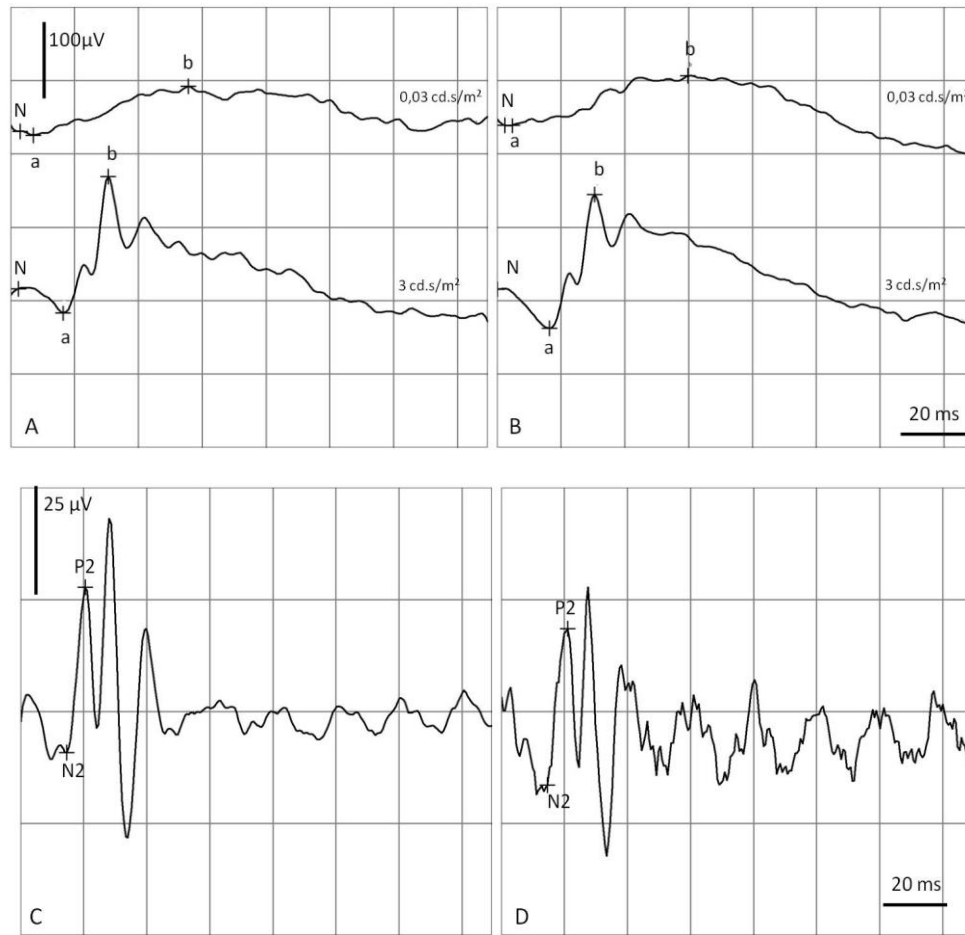


Figura 23. ERG escotópico a bajas y altas intensidades de flash en el OD (A) y el OS (B) al comienzo del experimento (N: momento del inicio del flash, a: onda a, b: onda b). C y D: PO del OD y el OS respectivamente (N2: momento del inicio del flash, P2: sumatorio de latencias de los PO).

La amplitud de la onda a no mostró diferencias significativas para ninguno de los dos ojos con respecto al tiempo, ni entre el OD y el OS en los ERG realizados en las semanas 5, 7, 9 y 11 del experimento. Estos resultados difieren de lo descrito por Moreno *et al.* (2005) con el mismo modelo de glaucoma, en el que sí observaron diferencias en las semanas 6 y 10. Sin embargo la amplitud de la onda b del OS mostró una reducción estadísticamente significativa en comparación con el OD en la semana 5, a altas intensidades de flash, coincidiendo con estos autores (Figura 24). En los ERG realizados en las semanas 7, 9 y 11, observamos una menor amplitud de la onda b en el OS con respecto al OD, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa. En el ojo glaucoma la amplitud de la onda b disminuyó aproximadamente un 30%, 28%, 36% y 29% de su valor basal en las semanas 5, 7, 9 y 11 del experimento respectivamente.

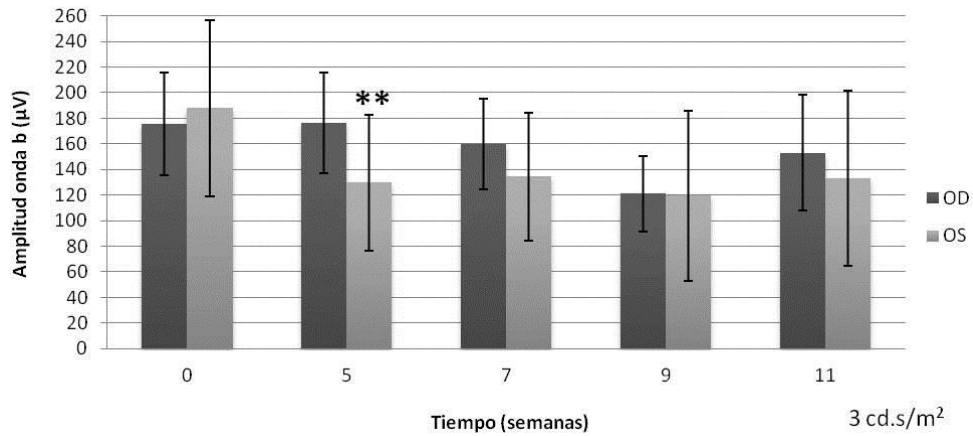


Figura 24. Amplitud de la onda b del OD y el OS, a altas intensidades de flash, a lo largo del experimento. Los datos se expresan como media \pm DE (n=15), **p<0,02.

En la siguiente Figura se muestra un ERG representativo realizado a las 5 semanas del comienzo de la fase experimental a bajas y altas intensidades de flash.

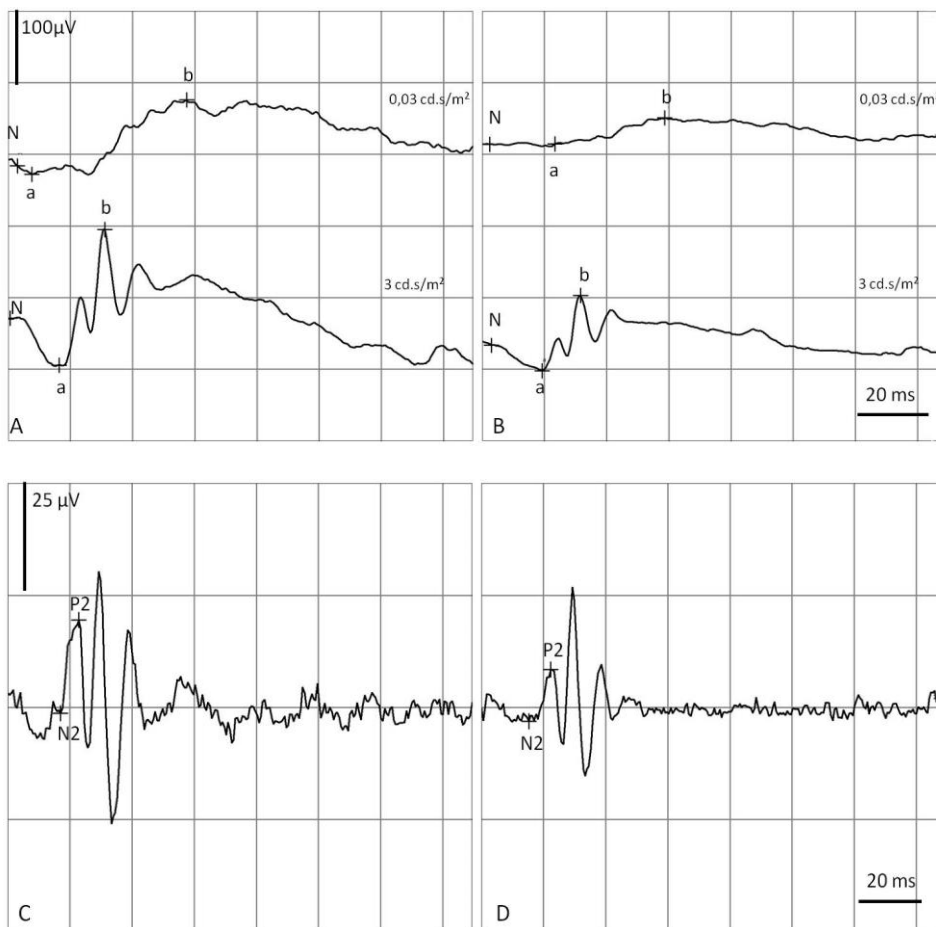


Figura 25. ERG escotópico, a bajas y altas intensidades de flash, en el OD (A) y el OS (B) tras cinco semanas del comienzo del experimento (N: momento del inicio del flash, a: onda a, b: onda b). C y D: PO del OD y el OS respectivamente (N2: momento del inicio del flash, P2: sumatorio de latencias de los PO).

La amplitud de la onda b del OS presentó una disminución, respecto al principio del experimento, desde la semana 5 hasta la semana 11, siendo estadísticamente significativa la reducción a bajas intensidades de flash a las 5 semanas (Figura 26). El OD también ha mostrado una tendencia descendente similar, aunque mucho menos evidente, siendo la reducción significativa en la semana 9 a altas intensidades de flash (Figura 27). Pensamos que este hecho puede estar relacionado con la paracentesis semanal, siendo la inflamación o el estrés oxidativo los fenómenos implicados (Hamasaki *et al.*, 1993). En este sentido, hubiera sido interesante medir objetivamente los efectos de la punción a través de marcadores inflamatorios. Moreno *et al.* (2005) no estudiaron la evolución temporal de este parámetro y por tanto no es posible realizar comparaciones en el mismo modelo de glaucoma.

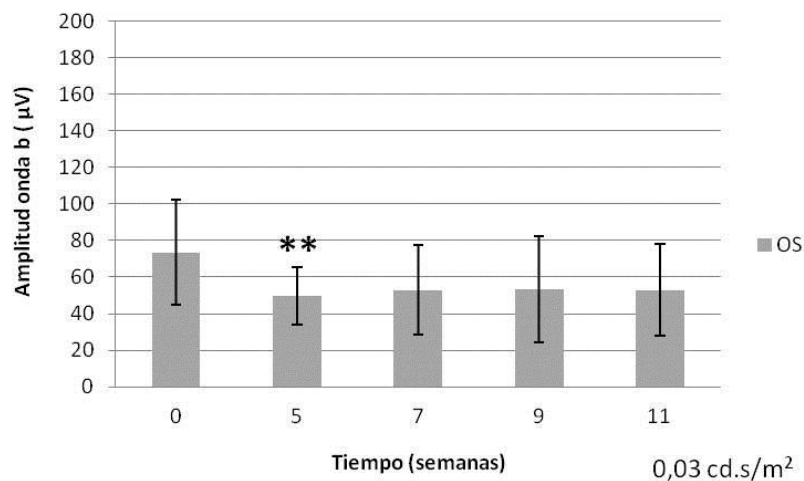


Figura 26. Evolución temporal de la amplitud de la onda b en el OS a bajas intensidades de flash. Los datos se expresan como media \pm DE (n=15), **p<0,02.

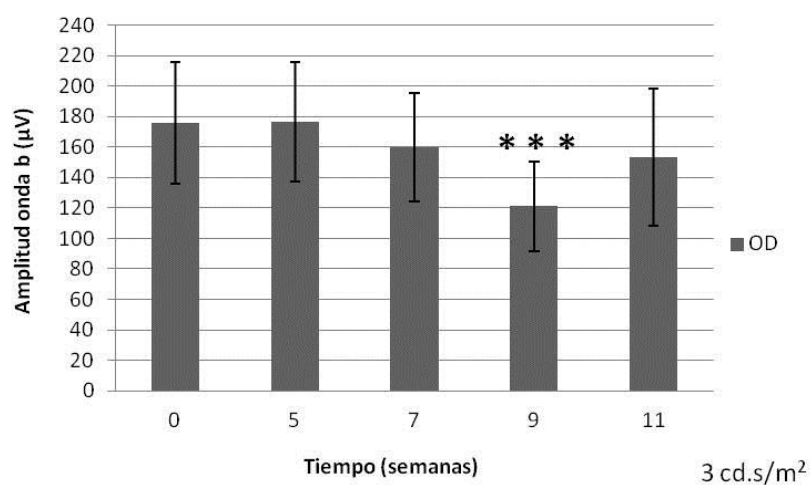


Figura 27: Evolución temporal de la amplitud de la onda b a altas intensidades de flash para el OD. Los datos se expresan como media \pm DE (n=15), ***p<0,001.

En todo el experimento no observamos diferencias en las latencias de las ondas a y b entre el OD y el OS, al igual que Moreno *et al.* (2005). Sin embargo, en el OS sí observamos, a altas intensidades de flash, un aumento significativo de la latencia de la onda b en las semanas 9 y 11 con respecto a la semana 0 (Figura 28) coincidiendo con varios autores en otros modelos de glaucoma (Bayer *et al.*, 2001b, Chauhan *et al.*, 2002, Bui *et al.*, 2005). En el OD, a altas intensidades de flash, la latencia de la onda a aumentó de manera significativa en la semana 11 (Figura 29) al igual que la latencia de la onda b en las semanas 9 y 11 (Figura 30), debido probablemente al efecto de las inyecciones repetidas.

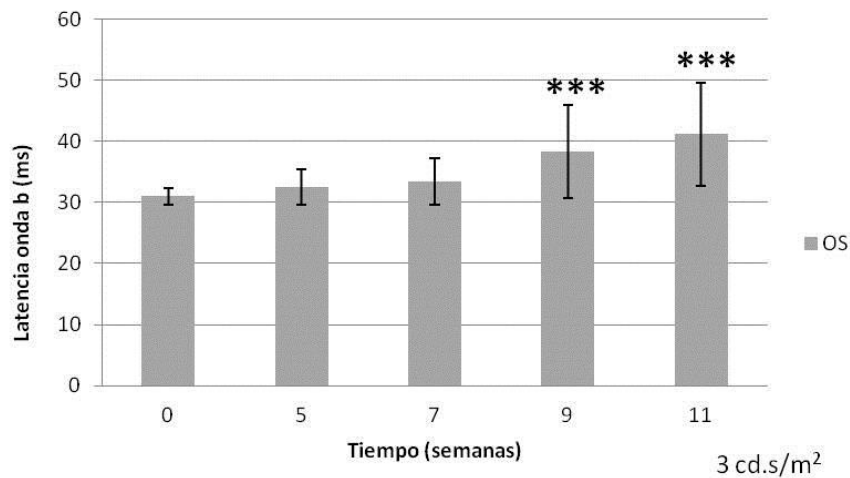


Figura 28. Evolución temporal de la latencia de la onda b del OS. Los datos se expresan como media \pm DE (n=15), ***p<0,001.

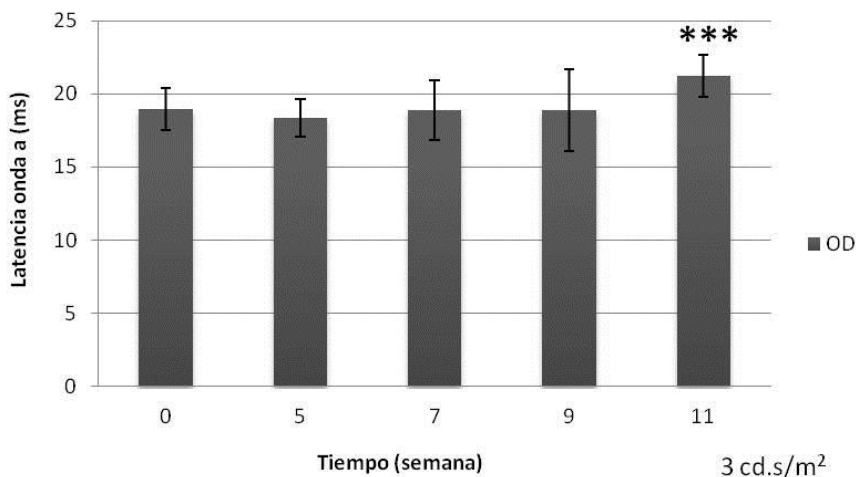


Figura 29: Evolución temporal de la latencia de la onda a del OD. Los datos se expresan como media \pm DE (n=15), ***p<0,001.

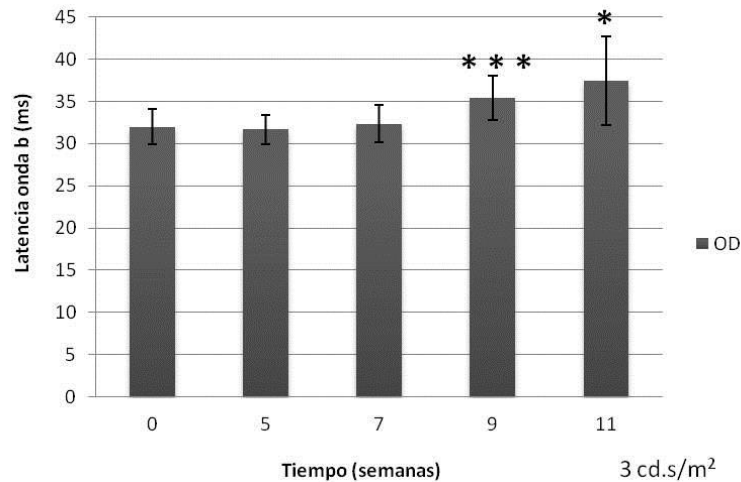


Figura 30. Evolución temporal de la latencia de la onda b del OD. Los datos se expresan como media \pm DE (n=15), *p<0,05, *p<0,001.**

El sumatorio de la amplitud de los PO mostró una reducción significativa en el OS con respecto al OD en las semanas 5 y 11. Esta disminución se mantuvo en la semana 7, si bien no fue estadísticamente significativa (Figura 31). En el ojo glaucoma el sumatorio de la amplitud de los PO disminuyó aproximadamente un 30%, 28%, 29% y 36% de su valor basal en las semanas 5, 7, 9 y 11 respectivamente.

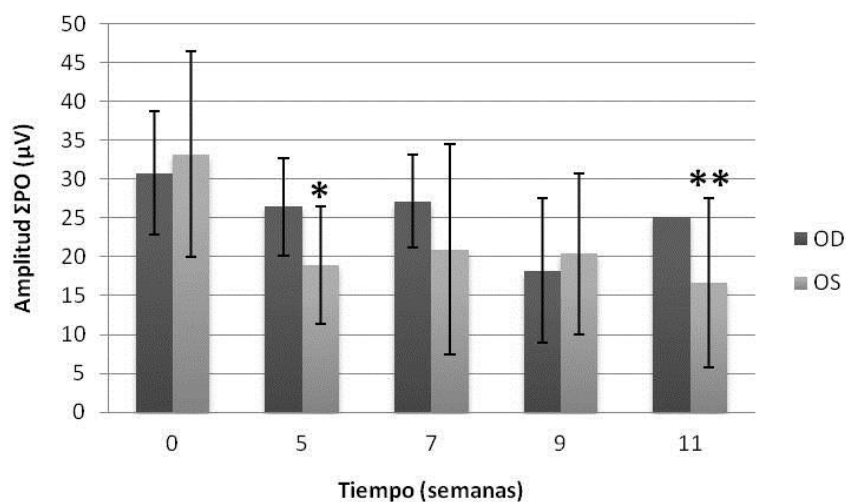


Figura 31. Comparación entre el sumatorio de la amplitud de los PO del OD y el OS a lo largo del experimento. Los datos se expresan como media \pm DE (n=15), *p<0,05, **p<0,02.

Estudiando la evolución del sumatorio de la amplitud de los PO a lo largo del experimento, en el OS comprobamos una disminución significativa en las semanas 5, 7, 9 y 11 con respecto al inicio, mientras que en el OD tan solo lo fue a las 9 semanas (Figura 32 A y B).

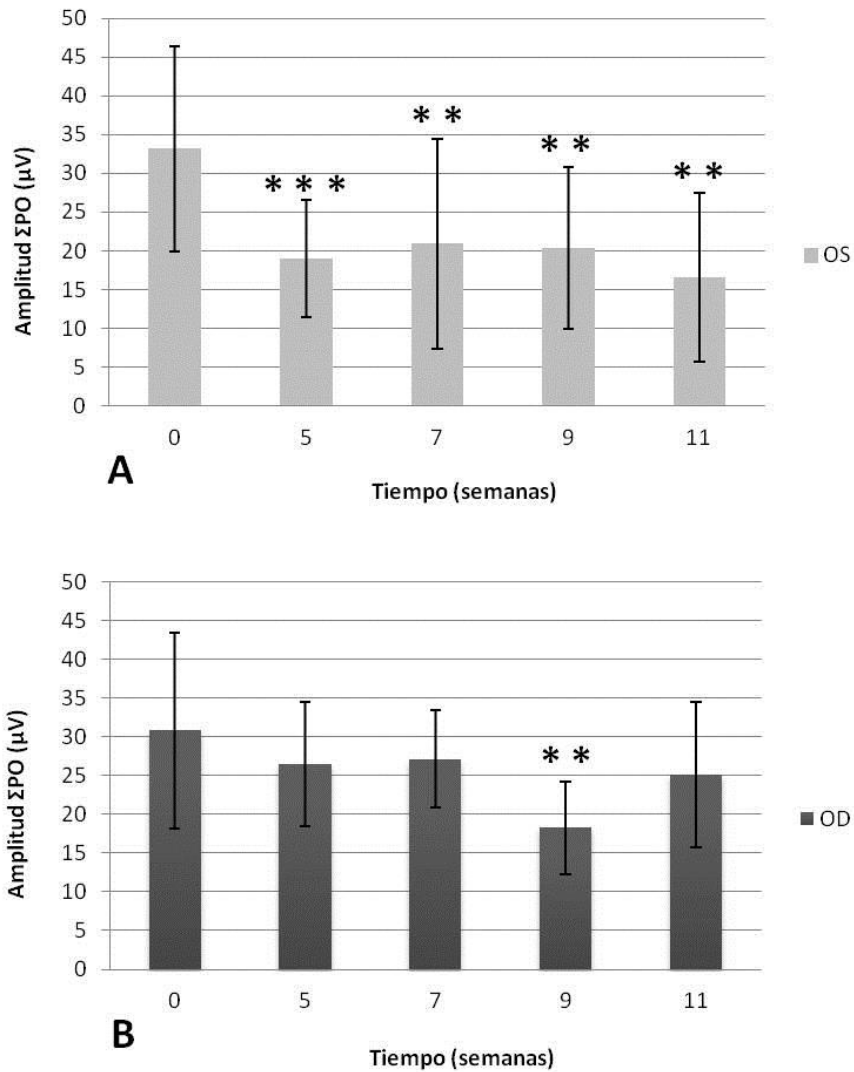


Figura 32. Evolución temporal del sumatorio de la amplitud de los PO en el OS (A) y en el OD (B). Los datos se expresan como media \pm DE (n=15), **p<0,02, *p<0,001.**

El sumatorio de las latencias de los PO no mostró diferencias entre el OD y el OS en ningún momento del experimento. Sin embargo en el OS sí observamos un aumento significativo del mismo en las semanas 9 y 11 con respecto a la semana 0; en el OD sólo observamos esta elevación significativa en la semana 11 (Figura 33 A y B).

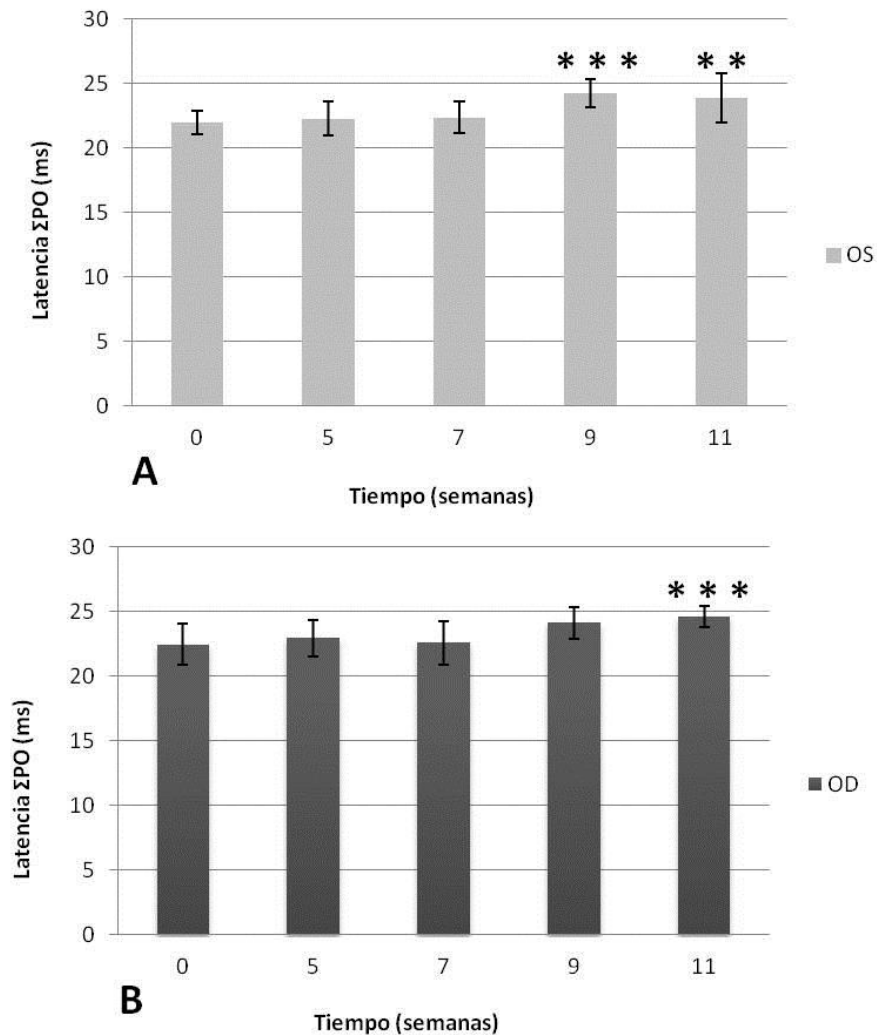


Figura 33. Evolución temporal del sumatorio de la latencia de los PO en el OS (A) y en el OD (B). Los datos se expresan como media \pm DE (n=15), **p<0,02, *p<0,001.**

Existen discrepancias sobre cuáles son los parámetros del ERG que reflejan con más antelación los cambios patológicos que tienen lugar en la retina glaucomatosa. Varios estudios experimentales han puesto de manifiesto que la elevación crónica de la PIO produce una reducción significativa de los PO escotópicos antes que la reducción de la amplitud y la prolongación de la latencia de las ondas a y b (Bayer *et al.*, 2001b, Moreno *et al.*, 2005). Además, este hecho es más evidente a bajas intensidades de flash (Bayer *et al.*, 2001b). Por ello, la suma de la amplitud de los PO en el ERG escotópico a bajas intensidades de flash se consolida como el indicador más temprano y sensible de la lesión glaucomatosa, tanto en los modelos de glaucoma crónico como agudo (Bayer *et al.*, 2001b, Bui *et al.*, 2005, Moreno *et al.*, 2005). La alteración prematura de los PO tiene sentido, pues anatómicamente la MPI (lugar donde algunos autores creen que se generan los PO) está estrechamente relacionada con la CCG (Korth, 1997).

Nuestros resultados han puesto de manifiesto que en la semana 5 del experimento se produjo una reducción significativa de la amplitud de la onda b y de los PO en el OS con respecto al OD a altas intensidades de flash, manteniéndose la tendencia descendente hasta la semana 11. Para poder afirmar cuál de los dos parámetros se redujo antes, deberíamos haber realizado los estudios electroretinográficos también en las semanas iniciales del experimento.

Por otro lado, según el estudio desarrollado en la rata por Fortune *et al.* (2004), el STR es el parámetro más sensible para detectar alteraciones funcionales retinianas secundarias al glaucoma. En este trabajo de investigación el resto de componentes del ERG (fotópico y escotópico), registrados con mayores intensidades de flash, se vieron alterados con aumentos más severos de PIO. Este hecho sugiere que las elevaciones moderadas de PIO producen una lesión selectiva de las CGR (reflejado en el STR), mientras que los aumentos más marcados producen un daño retiniano no selectivo que puede estar directamente relacionado con la PIO o indirectamente relacionado con la isquemia. Puesto que la intensidad de flash utilizada en esta investigación estuvo comprendida entre $-6,64$ y $-3,30 \log \text{cd.s/m}^2$ y estos valores son inferiores a la intensidad de flash más baja utilizada en nuestro estudio ($0,03 \text{cd.s/m}^2$), no es posible realizar comparaciones.

Nuestros resultados evidencian que la inyección semanal de AH, en la cámara anterior de la rata, indujo cambios funcionales retinianos significativos en el OS reflejados a nivel de la onda b y los PO. Puesto que la primera representa la actividad de las células de Müller y las células bipolares y estos últimos reflejan la actividad de los fotorreceptores (Dong *et al.*, 2004, Moreno *et al.*, 2005), la alteración de estos dos parámetros pone de manifiesto que este modelo produjo una degeneración del segmento externo de la retina que se prolongó a lo largo del tiempo.

El PERG está considerado como un indicador directo del estado de las CGR y la prueba más sensible en la detección de alteraciones funcionales secundarias al glaucoma en los humanos (Bach, 2001). Aunque se ha utilizado en roedores (Berardi *et al.*, 1990), es técnicamente mucho más complicado que el flash ERG, que tradicionalmente se ha establecido como un reflejo de la actividad de las neuronas distales a la CCG (Korth, 1997). Desde hace tiempo son muchos los estudios que han puesto de manifiesto una disminución de la amplitud de los PO y la onda a y b junto con un aumento de la latencia de la onda b en diferentes modelos de glaucoma (Mittag *et al.*, 2000, Bayer *et al.*, 2001a, Bayer *et al.*, 2001b, Bayer *et al.*, 2001c, Velten *et al.*, 2001a, Velten *et al.*, 2001b, Chauhan *et al.*, 2002, Moreno *et al.*, 2005, Salinas-Navarro *et al.*, 2009). Los cambios funcionales que hemos observado en la retina de las ratas fueron fácilmente registrables a través de los ERG, lo que refuerza la teoría de que esta técnica electrodiagnóstica es útil para evaluar la NOG de una manera no invasiva, especialmente en los modelos experimentales.

Hallazgos en el perfil metabolómico del humor acuoso tras la inducción del glaucoma

En nuestro conocimiento este trabajo es el primer estudio metabolómico desarrollado en la rata mediante RMN sobre los efectos del glaucoma a nivel del HA.

El HA del OD y el OS procedente de 15 ratas del grupo glaucoma experimental y 2 ratas del grupo control fue extraído para su análisis mediante RMN, minutos antes de la perfusión de los animales. En dos OS y un OD la muestra se contaminó con una pequeña cantidad de sangre tras el contacto de la aguja con el iris por lo que fueron eliminadas del estudio. Puesto que las cuatro muestras de las ratas control fueron consideradas como OD, finalmente analizamos 18 OD y 13 OS.

En general, la calidad de los espectros fue buena a pesar de la poca cantidad de muestra (15 μ l) y la baja concentración de los metabolitos. De la misma manera que en el estudio de Tessem *et al.*

(2005), observamos zonas donde las señales aparecen aisladas y su asignación es sencilla. Asimismo en la región comprendida entre 3-4,5 ppm se concentran y superponen gran cantidad de señales, con diferentes multiplicidades, que dificultan la correcta identificación y posterior cuantificación de los picos (Figura 34). En la región comprendida entre 4,7-4,8 ppm aparece la señal residual, ancha y distorsionada, de la molécula del H₂O después de aplicar un pulso de presaturación sobre la misma.

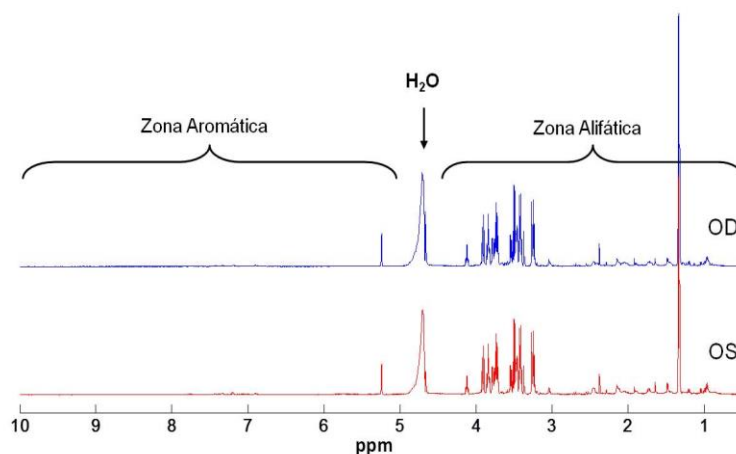


Figura 34. Espectro representativo del HA procedente del OD y el OS en el que se muestran las zonas aromática y alifática.

En la Figura 35 se muestra la comparación entre el perfil metabolómico del HA del OD y del OS, así como la asignación de resonancias correspondientes a varios metabolitos presentes en la zona alifática del espectro. Algunos metabolitos presentaron más de una señal, cada una de las cuales corresponde a un protón o grupo de protones con un entorno químico diferenciado. Al igual que en otros estudios realizados con muestras de HA de diferentes especies (Brown *et al.*, 1986, Tkadlecova *et al.*, 1999, Tessem *et al.*, 2005) la mayoría de resonancias se obtuvieron en la región espectral de 0 a 5 ppm (región alifática). En la región de 5-10 ppm (región aromática) sólo se observaron las asignadas a metabolitos tales como glucosa, tirosina y fenilalanina.

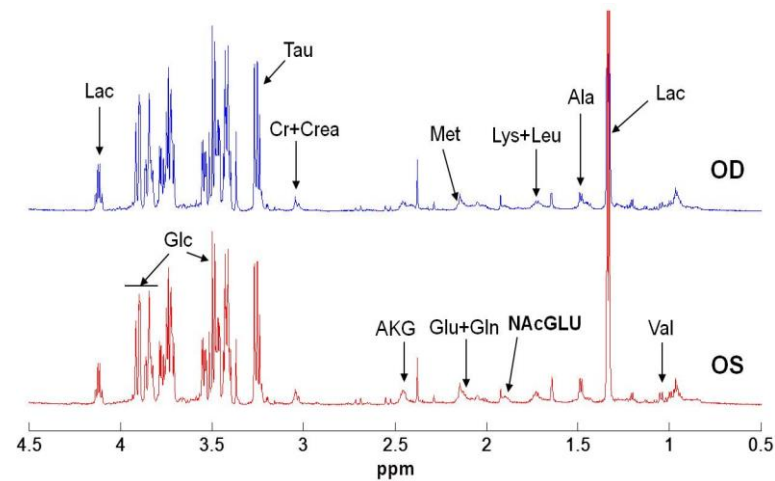


Figura 35. Comparación entre el perfil metabolómico del HA del OD y el OS y asignación de diferentes metabolitos de la zona alifática.

En los dos ojos las señales más intensas del espectro fueron asignadas al lactato y la glucosa, dos metabolitos esenciales para la córnea, la lente, el cuerpo ciliar y la retina, que en condiciones normales se encuentran en el HA en una concentración superior a la del plasma (Riley, 1972). Este hecho coincide con otros estudios realizados con muestras de HA procedentes de ojos de personas, bacalao y conejo (Brown *et al.*, 1986, Gribbestad y Midelfart, 1994, Midelfart *et al.*, 1996c).

Aunque el HA es un filtrado del plasma sanguíneo su composición química es distinta, siendo la concentración de proteínas y de AA los principales elementos diferenciadores (Tkadlecova *et al.*, 1999). Debido a la baja concentración de proteínas que tiene, es posible analizarlo directamente por RMN sin ser necesario un tratamiento previo de la muestra, asumiéndose en tal caso que los picos asignados a aminoácidos específicos proceden de aminoácidos libres y no de los péptidos o de las proteínas (Brown *et al.*, 1986, Srivatsa *et al.*, 1991, Gribbestad y Midelfart, 1994). En las muestras de HA analizadas se ha determinado la presencia de gran cantidad de aminoácidos, como por ejemplo: valina, alanina, lisina/leucina, glutamato, glutamina, metionina, taurina y fenilalanina; todos ellos han sido descritos previamente en posiciones similares del espectro (Brown *et al.*, 1986, Gribbestad y Midelfart, 1994, Midelfart *et al.*, 1996c, Tessem *et al.*, 2005).

El AA es un antioxidante presente en el HA en una concentración muy superior a la del plasma en numerosas especies diurnas, pues protege las estructuras intraoculares del daño foto-oxidativo (Reiss *et al.*, 1986, Rose y Bode, 1991, Ringvold *et al.*, 2000). Varios trabajos de investigación realizados con muestras de HA procedentes de ojos de conejo y de humanos han identificado la presencia de este metabolito en forma de doblete entre 4,0-4,5 ppm del espectro (Brown *et al.*, 1986, Gribbestad y Midelfart, 1994); sin embargo, el análisis del HA procedente de

ambos ojos en nuestro estudio no ha evidenciado la presencia de AA en esta posición. Según DiMattio (1989), los niveles de AA en la rata (especie nocturna) son inferiores en comparación con las especies diurnas en el plasma, el HA y el vítreo. Mientras que este autor encontró en el HA una concentración de 2 mg/100 ml, Cole (1970) describió una concentración muy inferior (0,0 mg/100 ml); ambos trabajos se realizaron mediante cromatografía en capa fina. En nuestro conocimiento no existen estudios realizados con RMN sobre el perfil metabólico del HA en la rata, por lo que es difícil realizar comparaciones. Sin embargo, no debemos olvidar que en relación con otras técnicas espectroscópicas o cromatográficas la RMN es menos sensible, no pudiendo cuantificar concentraciones inferiores a 0,1 mM (Midelfart *et al.*, 1996c).

Con la intención de observar las diferencias entre el perfil metabólico del OD y el OS y de identificar qué variables contribuyeron más a la diferenciación, aplicamos un PCA al conjunto de datos. El PCA es una técnica estadística no supervisada (no es necesario conocer a qué grupo pertenece cada muestra para su análisis) que permite proyectar en un espacio de pocas dimensiones la complejidad de un sistema experimental multivariable. Se usa más comúnmente para identificar cómo una muestra es diferente de otra, qué variables contribuyen más a esa diferencia y si esas variables participan de la misma manera (están correlacionadas) o de forma independiente (no están correlacionadas). Mediante este análisis (Figura 36) observamos cómo la muestra procedente del OS de la rata 8 (08 OS) presentó diferencias metabólicas estadísticamente significativas con respecto al resto de OS por lo que fue considerada como un *outlayer* y no fue incluida en análisis posteriores. Este animal perteneciente al grupo glaucoma experimental, desarrolló una hernia de iris grave en la semana 4ª del experimento que se mantuvo hasta la última semana, momento en el cual se desprendió. La uveítis asociada a la hernia de iris puede ser la responsable del descenso significativo de los metabolitos que se reflejan en la Tabla 3 (Yadav *et al.*, 2010).

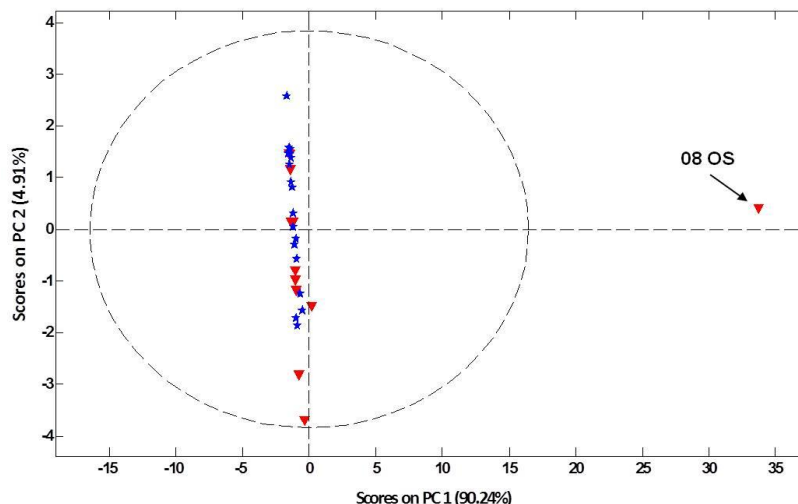


Figura 36. PCA donde se señala la posición del *outlayer* 08 OS. En rojo se exponen las muestras correspondientes al OS y en azul al OD.

Tabla 3. Regiones con diferencias estadísticamente significativas entre la muestra 08 OS y el resto de OS.

Metabolitos	Región	p	OS	8 OS
Lactato	1,31-1,345	0,002	0,146 ± 0,007	0,041
Alanina	1,46-1,50	0,0008	0,0177 ± 0,0007	0,0055
Acetoacetato	2,27-2,305	0,0005	0,0059 ± 0,0002	0,0016
Succinato/Piruvato	2,365-2,39	0,001	0,0098 ± 0,0005	0,0023
Glutamina	2,44-2,49	0,009	0,0157 ± 0,001	0,0043
Glucosa	3,45-3,55	0,000002	0,139 ± 0,003	0,0371
Glucosa	3,80-3,87	0,000003	0,0651 ± 0,001	0,0255
Glucosa	5,215-5,28	0,000002	0,0253 ± 0,0006	0,0074

Los resultados se expresan como media del área contenida en la región señalada ± DE, excepto para los valores de área de la muestra aislada donde el cálculo del error es imposible.

En el resto de muestras no observamos un agrupamiento espontáneo acorde a los criterios de clasificación de OD y OS, por lo que empleamos rutinas de análisis discriminante tipo PLS-DA, con el fin de maximizar la separación de los dos grupos (Figura 37). El PLS-DA es una técnica de discriminación supervisada que maximiza la separación entre grupos de observaciones de los componentes rotatorios del PCA, de tal modo que se obtiene una separación máxima entre las clases (Trygg *et al.*, 2007, Young y Wallace, 2009).

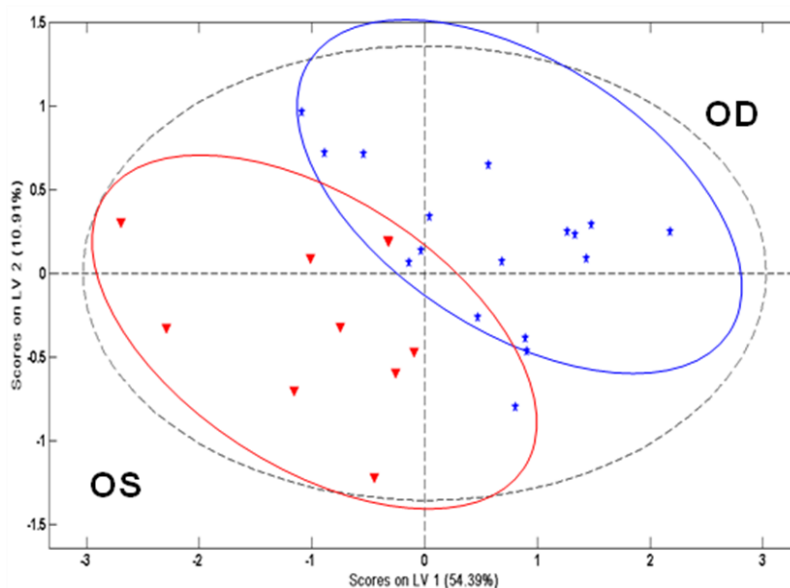


Figura 37. Diagrama de puntuaciones del PLS-DA (parte alifática) maximizado. En rojo se exponen las muestras correspondientes al OS y en azul al OD.

El PLS-DA generó un modelo discriminatorio con nuevas variables fruto de la combinación lineal de las variables primitivas, en nuestro caso, regiones del espectro. Las variables que mostraron diferencias estadísticamente significativas entre OD y OS vienen representadas en la Tabla 4 y Figuras 38 y 39.

Tabla 4. Metabolitos que contribuyeron de manera significativa a la construcción del modelo discriminatorio.

Metabolitos	Región	p	OS	OD
Acetato	1,915-1,935	0,04	0,0054 ± 0,001	0,0046 ± 0,0008
Acetoacetato	2,27-2,305	0,03	0,0059 ± 0,0008	0,0053 ± 0,0006
Ácidos grasos	2,305-2,315	0,03	0,0013 ± 0,0001	0,0011 ± 0,0002
Alanina	1,425-1,50	0,01	0,0255 ± 0,003	0,0227 ± 0,003
Citrato	2,68-2,725	0,02	0,0058 ± 0,0007	0,0051 ± 0,0008
Colesterol	1,065-1,145	0,03	0,012 ± 0,002	0,0108 ± 0,001
Creatina/Creatinina	3,03-3,07	0,01	0,0104 ± 0,001	0,0089 ± 0,002
Desconocido	2,92-2,93	0,00	0,0013 ± 0,0002	9,98e ⁻⁴ ± 0,0002
Glucosa	5,215-5,28	0,01	0,0253 ± 0,002	0,0271 ± 0,001
Glutamato+Glutamina	2,085-2,14	0,01	0,0172 ± 0,004	0,0138 ± 0,003
Glutamina	2,44-2,49	0,03	0,0157 ± 0,003	0,0123 ± 0,004
H-L-Prolina	2,16-2,19	0,01	0,0049 ± 0,0008	0,0041 ± 0,0007
Lípidos/Colesterol	0,88-0,895	0,05	0,0029 ± 0,0008	0,0025 ± 0,0005
Lisina	1,69-1,76	0,00	0,02 ± 0,002	0,0176 ± 0,002
Valina	1,02-1,06	0,01	0,0095 ± 0,0004	0,0084 ± 0,0002
VLDL	0,82-0,88	0,04	0,0115 ± 0,003	0,0091 ± 0,003

Los resultados se expresan como media del área contenida en la región señalada ± DE.

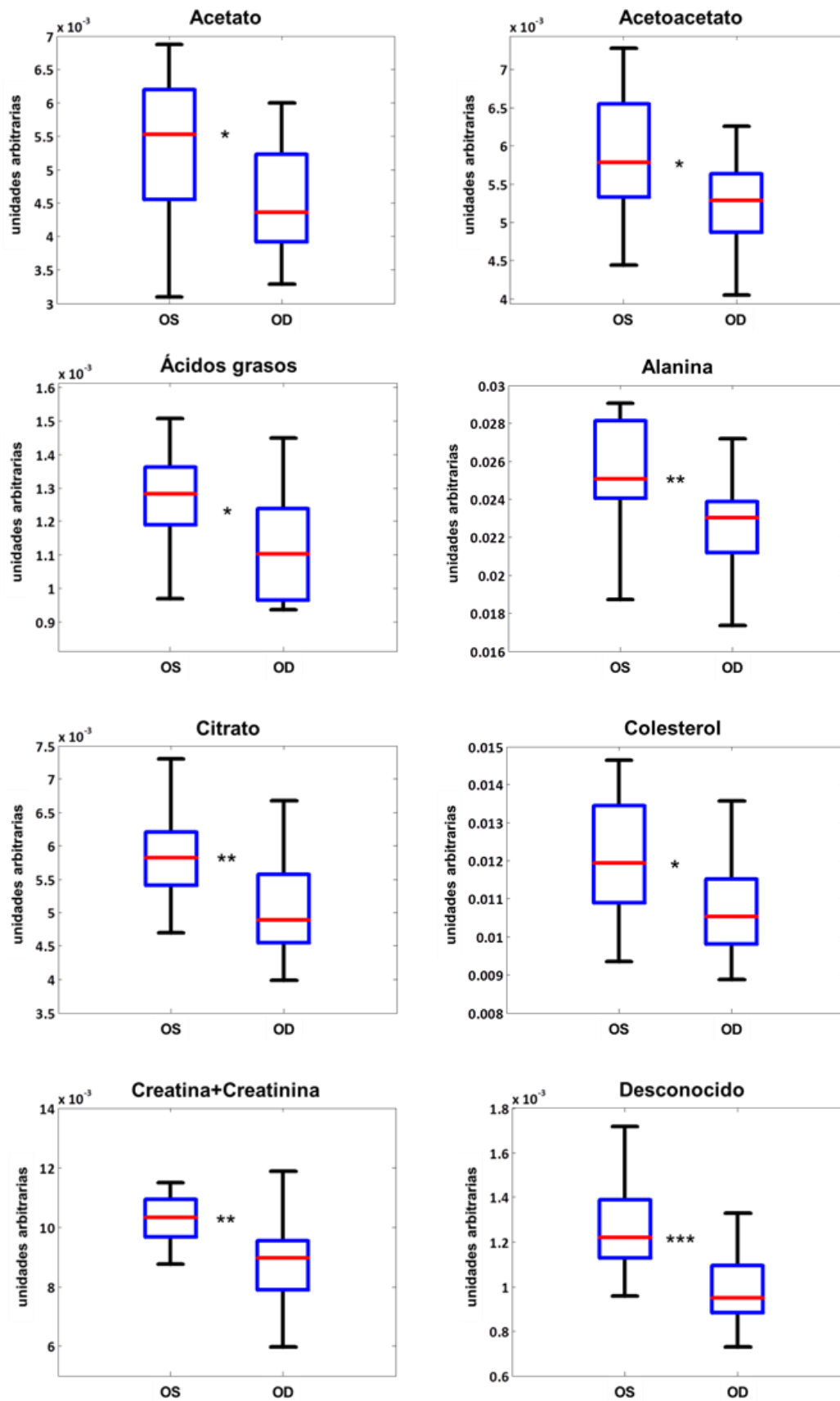


Figura 38. Metabolitos, ordenados alfabéticamente, que contribuyeron de manera significativa a la construcción del modelo discriminatorio, * $p < 0,05$, ** $p < 0,02$, *** $p < 0,001$.

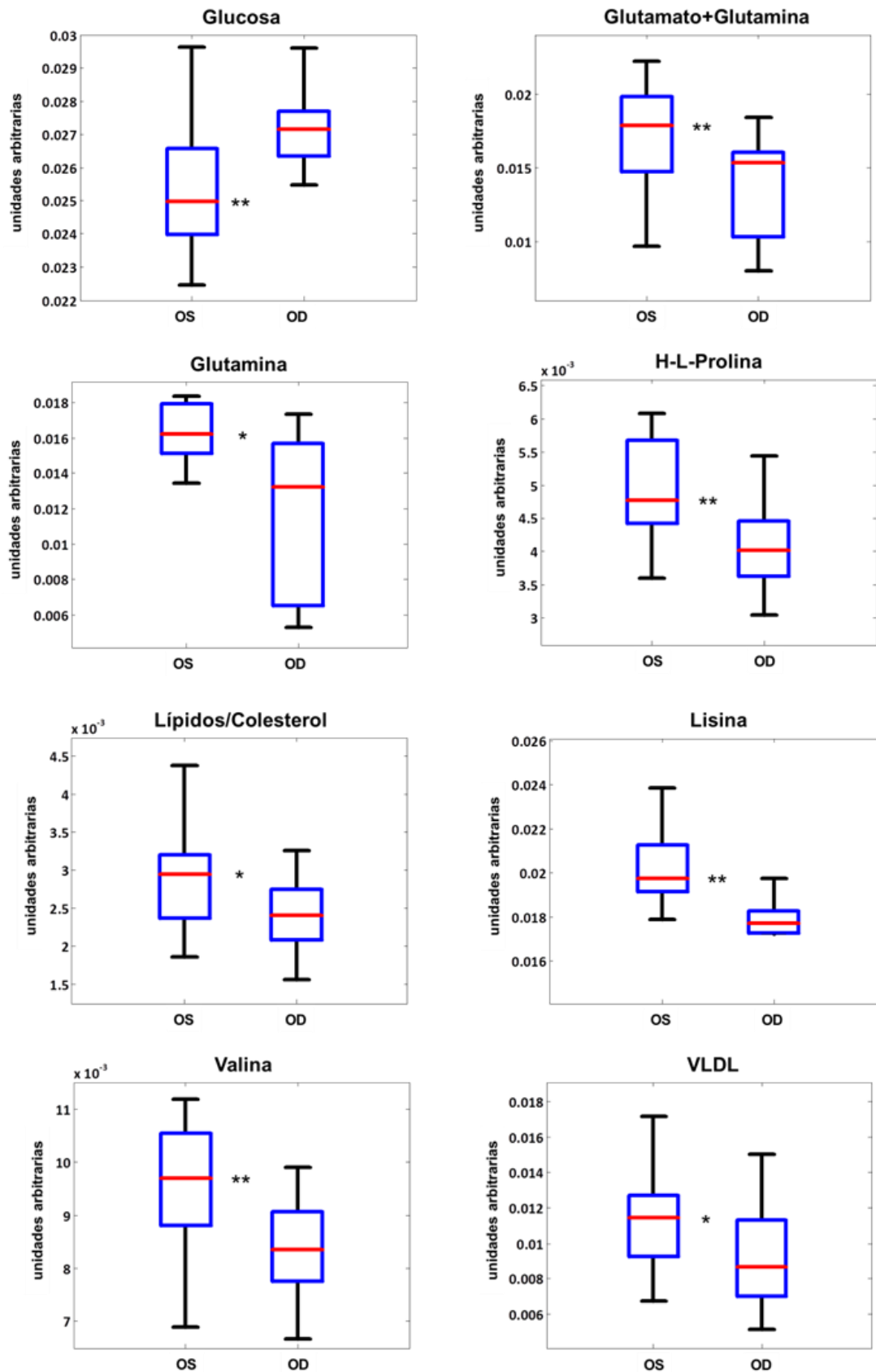


Figura 39. Metabolitos, ordenados alfabéticamente, que contribuyeron de manera significativa a la construcción del modelo discriminador, *p<0,05, **p<0,02.

En la siguiente tabla se incluyen otros metabolitos cuyas diferencias entre OD y OS, aunque no resultaron ser estadísticamente significativas (debido a que nuestro estudio está compuesto por un número de muestras relativamente bajo), pueden aportar información valiosa complementaria a la Tabla anterior.

Tabla 5. Metabolitos que no contribuyeron de manera significativa a la construcción del modelo discriminatorio.

Metabolitos	Región	p	OS	OD
Fenilalanina	7,33-7,36	0,30	$0,0029 \pm 3e^{-4}$	$0,0028 \pm 4e^{-4}$
Glucosa	3,45-3,55	0,05	$0,026 \pm 0,002$	$0,027 \pm 0,002$
Lactato	1,31-1,35	0,19	$0,11 \pm 0,02$	$0,12 \pm 0,02$
Lactato	4,09-4,15	0,20	$0,018 \pm 0,003$	$0,019 \pm 0,002$
Leucina	3,715-3,735	0,11	$0,031 \pm 0,003$	$0,033 \pm 0,003$
Lisina	3,75-3,77	0,19	$0,015 \pm 0,002$	$0,016 \pm 0,002$
N-acetilglutamato	1,865-1,91	0,05	$0,008 \pm 0,002$	$0,007 \pm 0,002$
Tirosina	6,84-6,93	0,12	$0,0054 \pm 4e^{-4}$	$0,0050 \pm 7e^{-4}$
Tirosina	7,175-7,25	0,07	$0,0067 \pm 6e^{-4}$	$0,0063 \pm 6e^{-4}$

Los resultados se expresan como valor medio del área comprendida en la región del espectro señalada \pm DE. Para un mismo metabolito hay varias regiones; todas siguen la misma tendencia pero pueden presentar valores diferentes de significación estadística (valor de P).

A continuación se detallan los cambios más relevantes en el perfil de lípidos, hidratos de carbono y aminoácidos (Tabla 4 y Figuras 38 y 39).

Cambios en el perfil de lípidos

A las 11 semanas de la inducción del modelo de glaucoma crónico apreciamos diferencias significativas en el metabolismo de los lípidos/colesterol y ácidos grasos entre los dos ojos, siendo mayor la intensidad de la región en el OS con respecto al OD. Así mismo, observamos una mayor intensidad en la región de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) en el OS con respecto al OD. Estos cambios pueden estar relacionados con la patogénesis del glaucoma pues las VLDL inducen la expresión de proteínas de la matriz extracelular como la fibronectina, densificándola y dificultando así la filtración del HA a través de la malla trabecular (Akiba *et al.*, 2006).

Cambios en el perfil de aminoácidos

Los niveles de los aminoácidos alanina, glutamato+glutamina, glutamina, H-L-prolina, lisina y valina fueron significativamente superiores en el OS. El glutamato, la glicina y el ácido gamma-aminobutírico (GABA) son los principales aminoácidos neurotransmisores presentes en el globo ocular, especialmente en la retina. Por otro lado la glutamina, el aspartato, la alanina y la arginina son precursores que participan en la formación y degradación del glutamato y el GABA (Hu *et al.*, 2012).

El potencial tóxico del glutamato sobre la CCG está bien documentado desde hace años (Dreyer *et al.*, 1996) aunque su papel en la patogénesis del glaucoma todavía no está establecido (Okuno *et al.*, 2006). El OS ha presentado una mayor intensidad en la región espectral del glutamato y alguno de sus precursores en comparación con el OD; estos hallazgos están en concordancia con la teoría de la apoptosis como mecanismo fundamental del daño retiniano en el glaucoma y con otros trabajos de investigación realizados en humanos, monos, ratas y perros que padecieron un glaucoma natural o experimental (Dreyer *et al.*, 1996, Brooks *et al.*, 1997, Yoles y Schwartz, 1998, Okuno *et al.*, 2006, Doganay *et al.*, 2012). En cambio, otros estudios realizados en humanos, perros y ratas no han encontrado variaciones significativas en los niveles de glutamato entre los ojos glaucoma y los ojos control (Honkanen *et al.*, 2003, Kallberg *et al.*, 2007, Hu *et al.*, 2012). Atribuimos este hecho a que los autores han utilizado métodos de determinación diferentes (espectroscopía dentro de un estudio de imagen por resonancia magnética y cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)) o/y a que han comparado distintos tipos de glaucoma (GPAA, GAC y secundario a uveítis) con pacientes sometidos a vitrectomía, lo que pudo incrementar los niveles de glutamato.

En nuestro conocimiento, y según las fuentes bibliográficas consultadas, no existen estudios sobre el resto de aminoácidos que hemos detectado en el humor acuoso de la rata.

Cambios en el perfil de hidratos de carbono

El OS ha demostrado tener una reducción significativa de los niveles de glucosa con respecto al OD, debido a la disminución directa e indirecta del aporte de nutrientes y oxígeno asociada al aumento de la PIO en el OS. La hipertensión induce compresión de los tejidos y una reducción del flujo sanguíneo capilar (Burgoyne *et al.*, 2005).

El lactato es esencial para la producción de ATP y para la actividad excitatoria de las neuronas. Se acumula cuando el metabolismo oxidativo no es capaz de satisfacer el requerimiento de energía necesario (Schurr, 2002). En nuestro estudio, no hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas en los niveles de lactato entre el OD y el OS aunque sí una clara tendencia decreciente en el OS con respecto al OD. Esta reducción puede explicarla el hecho de que el lactato es el producto final de la glicólisis anaerobia, y en el OS los niveles de glucosa fueron inferiores a los del OD. No obstante, estos hallazgos difieren de lo descrito en varios trabajos de investigación en los que este metabolito aumenta en los ojos glaucoma con respecto a los control (Song *et al.*, 2011, Doganay *et al.*, 2012), si bien los resultados son difícilmente comparables: en el caso de Doganay *et al.* (2012) las estructuras analizadas fueron el NGL y el vítreo de personas con glaucoma mediante espectroscopía dentro de un estudio de imagen por resonancia magnética; y el estudio de Song *et al.* (2011) se basa en un modelo de glaucoma inducido por la administración de glucocorticoides en conejos, siendo la triamcinolona un fármaco con muchas influencias sobre el metabolismo de los hidratos de carbono.

Valoración histológica del daño retiniano asociado al glaucoma crónico

Para analizar el efecto del modelo de glaucoma crónico sobre el segmento posterior del globo ocular evaluamos la morfología de la retina y el NO. Algunas muestras de los OD y los OS se dañaron en el procesado de los tejidos, lo que explica la disparidad entre el número de retinas y NO procedentes de los ojos control y glaucoma.

En 9 ratas del grupo glaucoma experimental (8 OD y 7 OS) y 3 ratas del grupo control (3 OD y 2 OS) estudiamos el espesor (μm) de la CCG + CFN, de la MPI, de la CNI, de la MPE y de la capa de fotorreceptores (CNE+SEF) así como el espesor total de la retina. Asimismo realizamos el recuento de CGR + amacrinias desplazadas/100 μm presentes en la CCG. En 9 ratas del grupo glaucoma experimental (7 OD y 6 OS) y en 2 ratas del grupo control (2 OD) evaluamos el área total (μm^2) del NO.

Entre las retinas derechas e izquierdas pertenecientes al grupo glaucoma experimental no observamos diferencias estadísticamente significativas ni en el espesor total ni en el espesor de ninguna capa (Figura 40), coincidiendo con Moreno *et al.* (2005) en el mismo modelo de glaucoma crónico y con otros modelos (Levkovitch-Verbin *et al.*, 2002, Yu *et al.*, 2006). Sin embargo nuestros resultados difieren de los presentados por Guo *et al.* (2011) y Biermann *et al.* (2012) que describen una disminución del espesor global de la retina en su modelo de glaucoma, posiblemente por la afectación de otras células aparte de las CGR, lo cual depende del patrón de incremento de PIO.

En nuestro modelo, sorprendentemente, el espesor medio de todas las capas estudiadas en los OS fue superior al de los OD, si bien estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (Tabla 6). El glaucoma es una enfermedad degenerativa y progresiva que se caracteriza por la pérdida de CGR y atrofia del NO, por lo que cabría esperar un adelgazamiento de la CCG y CFN (Distelhorst y Hughes, 2003, Adatia y Damji, 2005, Morrison *et al.*, 2008). El grosor de la retina varía según su región anatómica; es menor en la periferia (0,1 mm) y va aumentando progresivamente hacia el polo posterior (0,23 mm). En el centro de la fovea adelgaza otra vez (0,1 mm) para aumentar de nuevo alrededor del NO (0,21 mm) (Spalton y Marshall, 1995). En nuestro caso hemos realizado cortes seriados de la retina periférica, tallando los bloques de parafina a varias alturas para obtener muestras de calidad; esto puede haber influido en el resultado, ya que se ha analizado la retina procedente de distintas áreas.

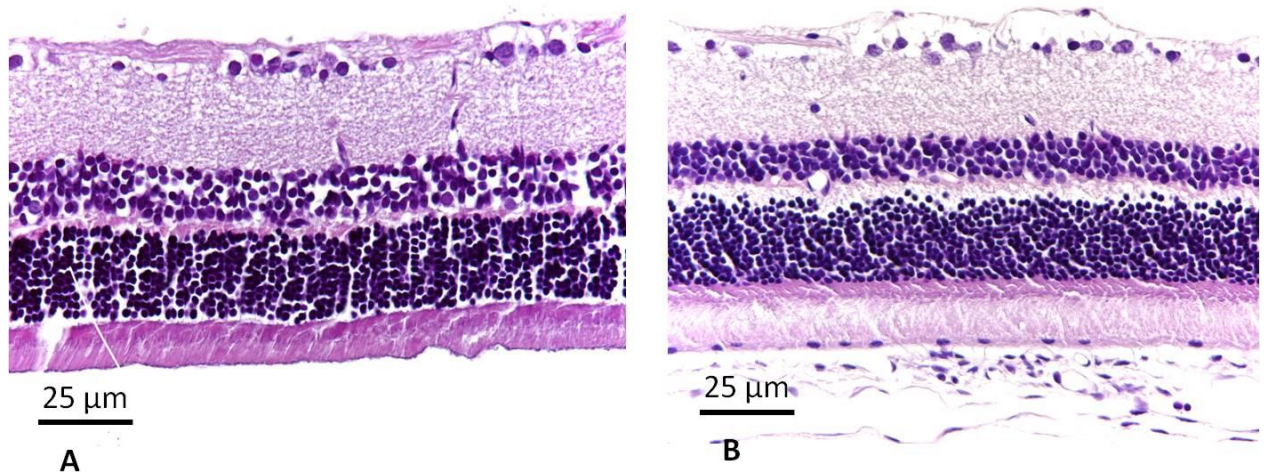


Figura 40. Sección transversal de una retina, teñida con hematoxilina eosina, perteneciente a una rata en la que un ojo ha sido inyectado con SSF (A) y el otro con AH (B) durante 10 semanas.

Tabla 6. Espesor medio total y de las distintas capas de la retina en los ojos de las ratas del grupo glaucoma experimental.

Espesor (μm)	OD	OS
Total	421,35 \pm 85,81	499,72 \pm 65,75
CCG + FN	41,02 \pm 13,89	45,32 \pm 13,29
MPI	108,49 \pm 40,00	134,58 \pm 21,56
CNI	55,03 \pm 15,11	65,60 \pm 9,97
MPE	20,68 \pm 3,88	23,88 \pm 3,36
CNE	113,70 \pm 16,65	128,72 \pm 22,04
SEF	72,43 \pm 13,27	85,21 \pm 12,56

Los valores se expresan como media \pm DE.

En la Tabla 7 se reflejan los valores promedio del espesor total de la retina y de cada una de las capas del grupo control, que no presentaron diferencias estadísticamente significativas con las retinas de los OD y los OS del grupo glaucoma experimental.

Tabla 7. Espesor medio total y de cada una de las capas de las retinas del grupo control.

Espesor (μm)	Ojos ratas control
Total	458,17 \pm 84,77
CCG + FN	40,26 \pm 14,00
MPI	119,89 \pm 21,74
CNI	70,35 \pm 18,06
MPE	31,22 \pm 10,84
CNE	114,33 \pm 57,47
SEF	77,69 \pm 13,90

Los valores se expresan como media \pm DE.

El primer paso para poder realizar un estudio cuantitativo de las CGR es su identificación y diferenciación con respecto a las células amacrinas desplazadas. En roedores éstas se encuentran en igual proporción que las CGR en la CCG (Perry, 1981, Perry *et al.*, 1983, Silveira *et al.*, 1989) y no son fácilmente distinguibles por la morfología o el tamaño celular. Aunque las células amacrinas son más pequeñas que la mayoría de CGR, existe una superposición de tamaños entre las amacrinas grandes y las CGR pequeñas (Perry, 1981). Además, las CGR lesionadas pueden cambiar su fenotipo morfológico, haciendo más complicada todavía su diferenciación de otros tipos neuronales (Sellés-Navarro *et al.*, 1996). La identificación según criterios morfológicos se basa en analizar, por microscopía óptica, el tamaño del soma neuronal en secciones histológicas o retinas montadas en plano mediante tinciones celulares inespecíficas. Debido a que estos criterios son poco precisos, en nuestro caso hemos contado el número total de células presentes en la CCG

sin distinguir el tipo celular, tal y como hicieron Moreno *et al.* (2005) con el mismo modelo de glaucoma.

El recuento de células/100 μm (media \pm DE) presentes en la CCG de las retinas pertenecientes al grupo control fue de $14,11 \pm 4,91$ células/100 μm , valor superior al documentado por Moreno *et al.* (2005) con el mismo modelo de glaucoma. El promedio de células/100 μm presentes en la CCG de las retinas izquierdas (11,57 células/100 μm) del grupo glaucoma experimental no ha mostrado diferencias estadísticamente significativas con respecto a las derechas (10,75 células/100 μm) a diferencia de lo publicado por otros autores con el mismo y otros modelos de glaucoma (Bayer *et al.*, 2001c, Levkovitch-Verbin *et al.*, 2002, Moreno *et al.*, 2005, Yu *et al.*, 2006, Biermann *et al.*, 2012). Este hecho contrasta con la definición de glaucoma, que implica una pérdida irreversible de CGR (Distelhorst y Hughes, 2003, Adatia y Damji, 2005, Morrison *et al.*, 2008). Puesto que estas células se distribuyen heterogéneamente por toda la retina y su densidad disminuye conforme aumenta la distancia respecto del NO (Danias *et al.*, 2002), pensamos que la ausencia de diferencias en nuestro estudio puede ser debida a que hemos analizado en cada caso un área concreta de la retina, que ha variado dependiendo de cada ojo. Por otra parte, tanto el marcaje retrógrado con FG como la inmunodetección con Brn3a, que analizamos posteriormente en este trabajo, sí han puesto de manifiesto un menor número de CGR en los OS del grupo glaucoma, tal y como describieron Vidal-Sanz *et al.* (2012). En futuros estudios, para que el estudio histológico resulte consistente deberemos obtener muestras de retina del mismo nivel.

El NO de los ojos glaucoma mostró una pérdida generalizada de la uniformidad e integridad del patrón de tinción (Figura 41), coincidiendo con otros autores (Ueda *et al.*, 1998, Moreno *et al.*, 2005, Sappington *et al.*, 2010). El espacio entre axones aumentó por la pérdida de los mismos y el aparente desarrollo de células gliales, hecho que ha sido observado también en ojos glaucomatosos de personas (Ueda *et al.*, 1998).

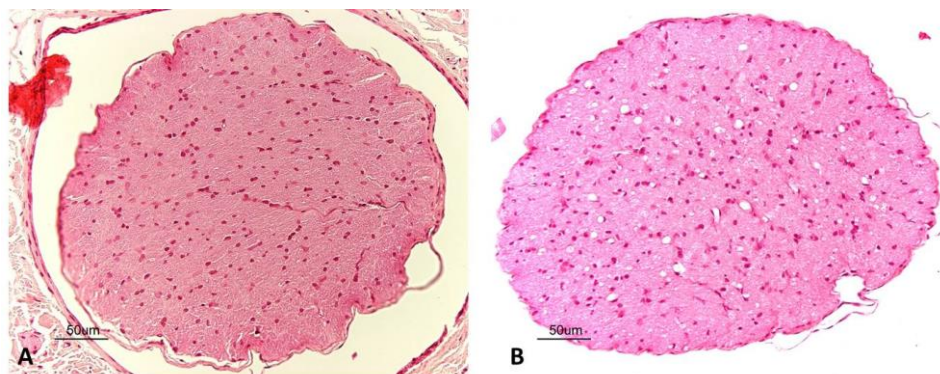


Figura 41. Sección transversal, teñida con hematoxilina eosina, del NO del ojo control con patrón de tinción homogénea (A) y del ojo glaucoma (B).

En el grupo glaucoma experimental el área transversal media del NO de los OS ($3,30 \times 10^6 \mu\text{m}^2$) no presentó diferencias estadísticamente significativas con respecto a los OD ($2,87 \times 10^6 \mu\text{m}^2$). Este resultado difiere de lo publicado por Mabuchi *et al.* (2003 y 2004) en su modelo de glaucoma desarrollado en el ratón, en el que el diámetro del NO disminuyó debido a la atrofia. Pensamos que nuestros resultados, pueden estar relacionados con el procesado de los NO, ya que, al igual que con las retinas, los bloques de parafina se tallaron a varias alturas para conseguir una muestra de calidad, y el diámetro del NO varía a lo largo de su recorrido (Jonas *et al.*, 1995).

En muchos trabajos experimentales sobre el glaucoma crónico desarrollados en la rata se ha evaluado el número y la distribución de los axones del NO (Ueda *et al.*, 1998, Levkovitch-Verbin *et al.*, 2002, Mabuchi *et al.*, 2003, Mabuchi *et al.*, 2004, Moreno *et al.*, 2005, Sappington *et al.*, 2010). En el nuestro, no hemos podido determinar si existen diferencias entre el número de axones de los ojos glaucoma y los ojos control, ya que para ello es fundamental utilizar objetivos de mayor aumento (de los que no disponíamos) o bien la microscopia electrónica (Levkovitch-Verbin *et al.*, 2002).

Estudio de la población de células ganglionares tras la inducción del glaucoma

Con la intención de valorar con más precisión que con la identificación y cuantificación histológica, el efecto del incremento de PIO sobre la población de CGR, realizamos la identificación, cuantificación y el estudio de la distribución de la población total de estas células combinando la aplicación de trazadores retrógrados con la inmunodetección con marcadores neuronales. Como hemos explicado previamente, el marcaje con FG se realizó en seis ratas, mientras que la inmunodetección con Brn3a se realizó en ocho.

Cuantificación y distribución de las células ganglionares de la retina trazadas retrógradamente con Fluorogold

La población de CGR trazadas retrógradamente con FG desde el CS se ha analizado en cinco ratas del grupo glaucoma experimental, para estudiar el efecto del aumento de la PIO sobre el transporte axonal, y en una rata del grupo control, para estudiar las CGR-FG⁺ de la retina intacta. Es importante destacar que las ratas fueron escogidas al azar y que el conteo celular fue un procedimiento realizado a ciegas.

El cómputo total de CGR-FG⁺ de las dos retinas de la rata control fue muy similar entre sí (OD: 103.630 CGR y OS: 101.603 CGR), siendo la media (102.616 CGR) comparable a la de Siu *et al.* (2002), que estimaron un total de 98.725 CGR en la rata albina Sprague-Dawley (SD). Nuestros recuentos son algo inferiores a lo descrito por Ko *et al.* (2001) en la rata Wistar (119.988 CGR) o Danias *et al.* (2006), que encontraron un total de 112.128 CGR en esa misma raza. En cambio nuestro resultado es superior al obtenido por Salinas-Navarro *et al.* (2009) en ratas adultas albinas (81.486 CGR) y pigmentadas (87.229 CGR). Estas diferencias pueden explicarse por diversos factores: las variaciones en la densidad de CGR a lo largo de toda el área retiniana; el número de zonas que se ha examinado; las diferencias genéticas entre razas; o los métodos empleados en la aplicación del trazador y en la estimación del total de la población de CGR (Fukuda *et al.*, 1982, Fileta *et al.*, 2008, Salinas-Navarro *et al.*, 2009).

Las retinas de los OD del grupo glaucoma experimental tuvieron una media de CGR-FG⁺ superior a las de los OS; estas diferencias no pudieron ser analizadas estadísticamente debido al bajo número de muestras (Tabla 8). El promedio de CGR-FG⁺ en el OS fue inferior al descrito por Salinas-Navarro *et al.* (2011) en su modelo de hipertensión ocular por fotocoagulación con láser. Es interesante resaltar que, aunque es necesario ampliar el número de animales para extraer conclusiones más firmes, nuestro modelo de glaucoma induce claramente a largo plazo un mayor descenso de CGR.

Tabla 8. Recuento de CGR-FG⁺ de las retinas del grupo glaucoma experimental.

Animal #	CGR-FG ⁺	
	OD	OS
1	90054	91843
2	93648	86930
3	90332	81037
4	93967	17593
5	95699	47753
Media	92740,00	65031,20
DE	2454,52	31636,75

En una rata (# 1), el OS tuvo un recuento de CGR-FG⁺ levemente superior al OD (Tabla 8). Puesto que con este animal no hubo ninguna incidencia en el momento de las inyecciones, atribuimos esta diferencia a la variabilidad en la severidad del daño retiniano que puede experimentar cada animal o bien a una menor difusión del trazador desde el CS a la retina del OD (Levkovitch-Verbin *et al.*, 2002, Vidal-Sanz *et al.*, 2012).

Al examinar las retinas con el microscopio de fluorescencia observamos cómo las CGR-FG⁺ pertenecientes a los dos ojos del grupo control y a los OD del grupo glaucoma experimental, no se distribuyeron uniformemente sino en un gradiente decreciente del centro a la periferia (Figura 42 A y C). En la mayoría de los casos la región que presentó una densidad celular más alta fue la superior, localizándose aproximadamente a 1 mm del NO y extendiéndose a lo largo del eje horizontal temporal. Estos resultados son similares a los observados previamente por otros autores (Fukuda, 1977, Perry, 1981, Salinas-Navarro, 2011, Vidal-Sanz *et al.*, 2012).

Para analizar con más detalle esta región de mayor densidad celular construimos los mapas de isodensidad de las retinas (Figura 42 B y D). Los códigos de colores revelaron que, en efecto, el área de mayor densidad de CGR (colores cálidos naranjas-rojos) se localizó a lo largo del eje nasotemporal dorsal de la retina adoptando la forma de una estría visual. Estos resultados coinciden con lo descrito por Salinas-Navarro *et al.* (2011) y sin embargo son diferentes a lo descrito por Danias *et al.* (2002), que concluyen que la distribución celular en la retina es homogénea, aunque no analizaron los mapas de isodensidad de alta resolución.

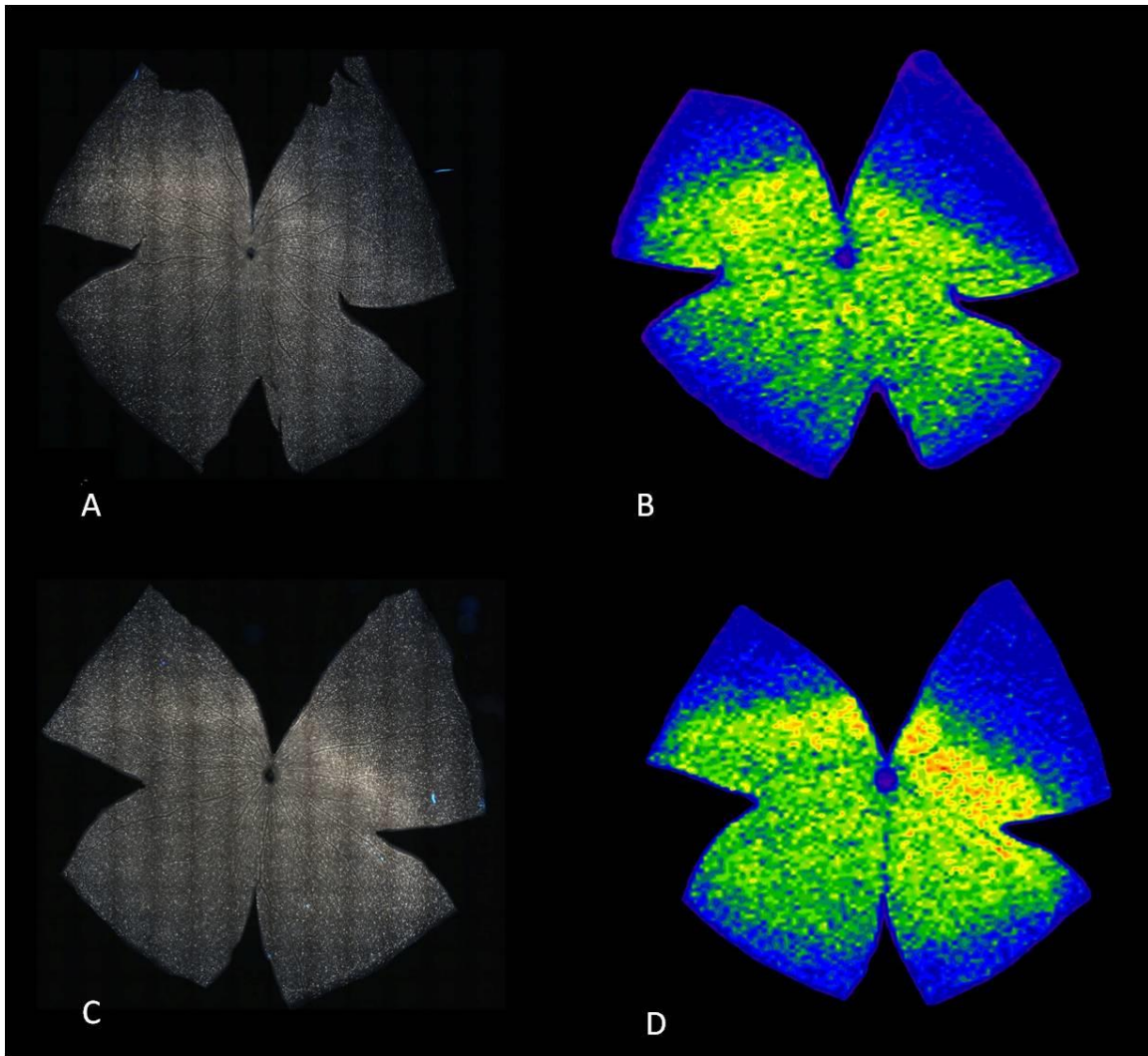


Figura 42. Distribución de la totalidad de la población de CGR-FG⁺. Fotomontaje de una retina derecha representativa del grupo glaucoma experimental (A) y una retina izquierda del grupo control (C) mostrando las CGR marcadas con FG. La zona con más alta densidad se distribuye a lo largo de una estría nasotemporal en la retina dorsal. Mapa de isodensidad (B y D) correspondiente a los fotomontajes de las dos retinas. En todas las retinas el polo dorsal está orientado a las 12 horas.

Los ojos glaucomatosos manifestaron gran variabilidad en la severidad del daño retiniano, al igual que en el estudio Levkovitch-Verbin *et al.* (2002). En dos OS se evidenció una ausencia casi completa de CGR-FG⁺ que adoptó una forma triangular con el vértice dirigido hacia el NO (Figura 43). Este hecho coincide con lo descrito por Vidal-Sanz *et al.* (2012) y está asociado a la distribución de los vasos sanguíneos alrededor de los haces de axones del NO típica de los roedores. Esta característica anatómica lleva implícito que ante un aumento considerable de PIO se produzca una intensa constricción de los vasos que ocasione la interrupción del transporte axonal y la muerte sectorial de las CGR (Villegas-Pérez *et al.*, 1998, Wang *et al.*, 2003). En el resto de retinas glaucomatosas se observaron grandes áreas con una pérdida localizada de CGR-FG⁺ y otras más pequeñas con pérdida difusa (Figura 44). El patrón de lesión retiniana obtenido en

nuestro modelo ha manifestado variaciones que posiblemente están relacionadas con el diferente grado de aumento de la PIO, hecho que no hemos podido estudiar con el Tono-Pen® Vet y que es importante tener en cuenta para futuras modificaciones en el modelo.

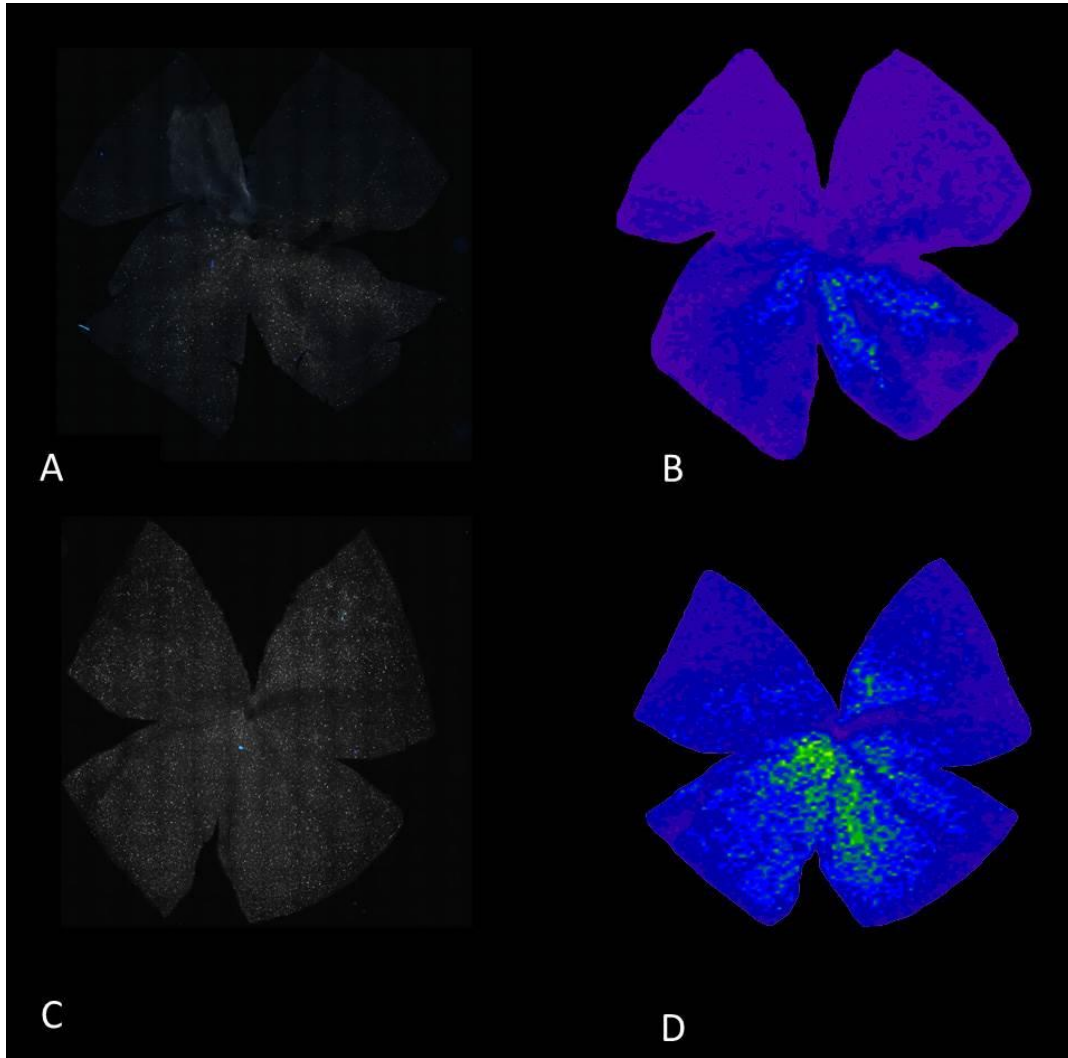


Figura 43. Ausencia casi completa de CGR-FG+ en dos OS del grupo glaucoma experimental. A y C: fotomontaje de dos retinas izquierdas que muestran la ausencia casi total de CGR-FG+ y sus correspondientes mapas de isodensidad (B y D). En las zonas de menor densidad celular los colores son más fríos que en las retinas control.

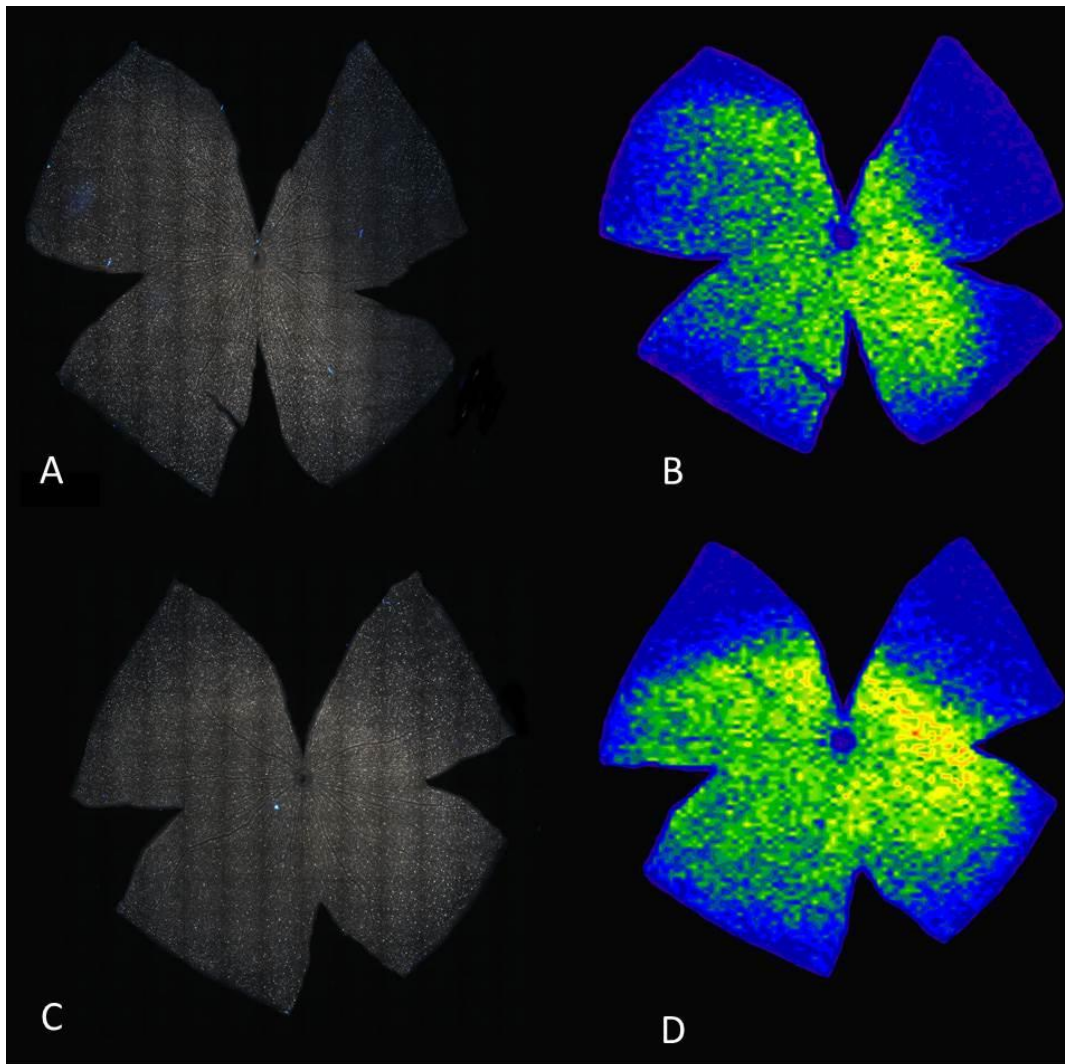


Figura 44. Distribución de las CGR trazadas con FG donde se muestra el patrón de pérdida de CGR-FG⁺ localizado (A y B) y difuso (C y D). A y C: fotomontaje de las dos retinas izquierdas y sus correspondientes mapas de isodensidad (B y D).

De la misma manera que en otros modelos de hipertensión ocular realizados en la rata (Levkovitch-Verbin *et al.*, 2002, Morrison *et al.*, 2008, Salinas-Navarro *et al.*, 2010, Vidal-Sanz *et al.*, 2012), las retinas glaucomatosas mostraron una mayor pérdida de CGR principalmente en la zona dorsal. El mecanismo responsable de este daño selectivo no se conoce exactamente, pero podría estar relacionado con la disposición de los vasos sanguíneos en la cabeza del NO justo antes de entrar en la retina (Mabuchi *et al.*, 2003, Mabuchi *et al.*, 2004, Salinas-Navarro *et al.*, 2010).

El análisis de la población de CGR-FG⁺ se ha realizado al finalizar la fase experimental. Aunque este no ha sido el objetivo de nuestro estudio, hubiera sido interesante comprobar el carácter progresivo de la NOG inducida en nuestro modelo animal, evaluando la pérdida de CGR trazadas con FG en distintos momentos a lo largo del experimento.

Marcaje neuronal de las células ganglionares de la retina con Brn3a

La población de CGR identificadas con Brn3a se ha analizado en 7 ratas del grupo glaucoma experimental y en una rata del grupo control. Al igual que para el marcaje con FG, las ratas fueron escogidas al azar y el conteaje celular fue un procedimiento realizado a ciegas.

Las retinas de los OD del grupo glaucoma experimental tuvieron una media de CGR-Brn3a⁺ superior a las de los OS, siendo estas diferencias estadísticamente significativas (Figura 45).

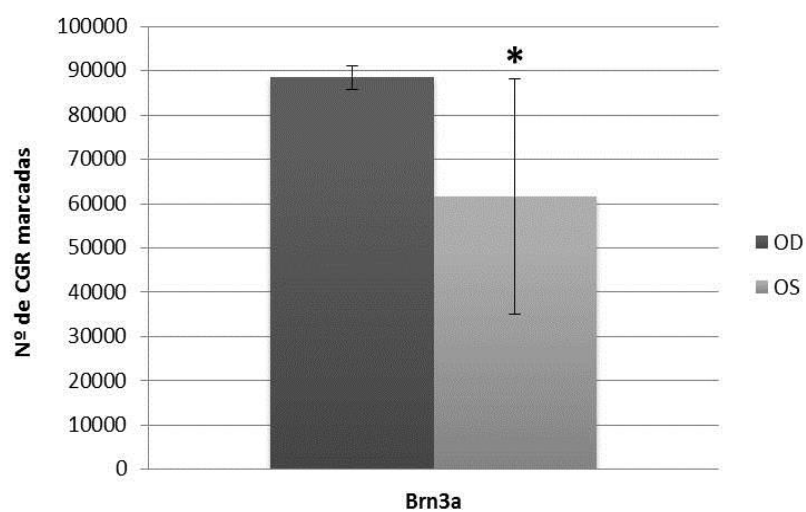
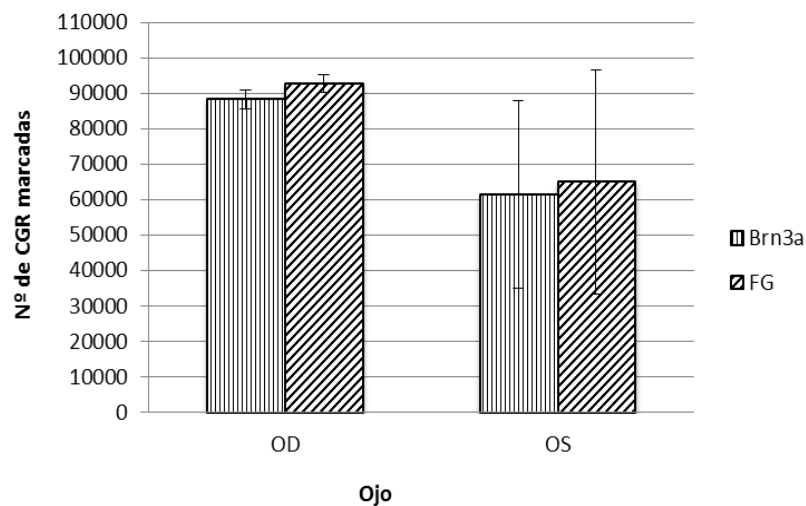


Figura 45. CGR inmunodetectadas mediante Brn3a en el OD y el OS. Los histogramas muestran la media \pm DE, * $p < 0,05$

En las retinas de los OD del grupo glaucoma experimental y en las retinas del grupo control (n=9) la distribución de CGR-Brn3a⁺ fue paralela a la de CGR-FG⁺ (Tabla 9 y Figura 46), tal y como describieron Nadal-Nicolás *et al.* (2009) y Vidal-Sanz *et al.* (2012).

Tabla 9. CGR trazadas y marcadas con Brn3a al finalizar el modelo experimental.

Animal #	OD		OS	
	CGR-FG ⁺	CGR-Brn3a ⁺	CGR-FG ⁺	CGR-Brn3a ⁺
1	90054	85285	91843	86390
2	93648	85965	86930	80220
3	90332	87622	81037	79876
4	93967	88247	17593	25883
5	95699	91431	47753	44347
6		87492		82570
7		92389		31466
Media	92740,00	88347,29	65031,20	61536,00
DE	2454,52	2650,95	31636,75	26509,12

**Figura 46. CGR trazadas con FG y marcadas con Brn3a al finalizar el modelo experimental. Los histogramas muestran la media \pm DE.**

Tanto en el grupo glaucoma experimental como en el grupo control, la mayoría de ojos mostraron un número total de CGR-Brn3a⁺ inferior al de CGR-FG⁺ (Tabla 9). Este hecho se observa claramente comparando los mapas de isodensidad para los dos tipos de marcaje (Figura 47). En el mapa correspondiente a las CGR-FG⁺ se aprecia que hay más colores cálidos que en el de las CGR-Brn3a⁺. Nuestro resultado es contradictorio teniendo en cuenta que el Brn3a detecta las CGR supervivientes, mientras que el FG es un indicador del transporte axonal activo de estas células. De hecho, nuestros resultados difieren de lo descrito por Vidal-Sanz *et al.* (2012) en su modelo de glaucoma (fotocoagulación con láser del tejido limbar) realizado en la rata albina SD. En este modelo, a los 8 días del incremento de la PIO el número de CGR-Brn3a⁺ fue superior al número de CGR-FG⁺ y posteriormente fue descendiendo significativamente hasta los 35 días; lo que refuerza la teoría de que las células comienzan a perder su funcionalidad normal antes de morir (Lafuente

et al., 2002). En trabajos realizados por Galindo-Romero *et al.* (2011) se han descrito diferencias en el número de CGR-Brn3a⁺ entre distintas razas, por lo que es posible que las ratas de nuestro estudio, de raza Wistar, presenten un menor número de CGR-Brn3a⁺ que las SD utilizadas por Vidal-Sanz *et al.* (2012). Por otro lado puede haber variabilidad asociada a la propia técnica, por lo que hubiera sido interesante estudiar la evolución del marcaje con FG y Brn3a a lo largo del experimento, y no sólo al final del modelo experimental.

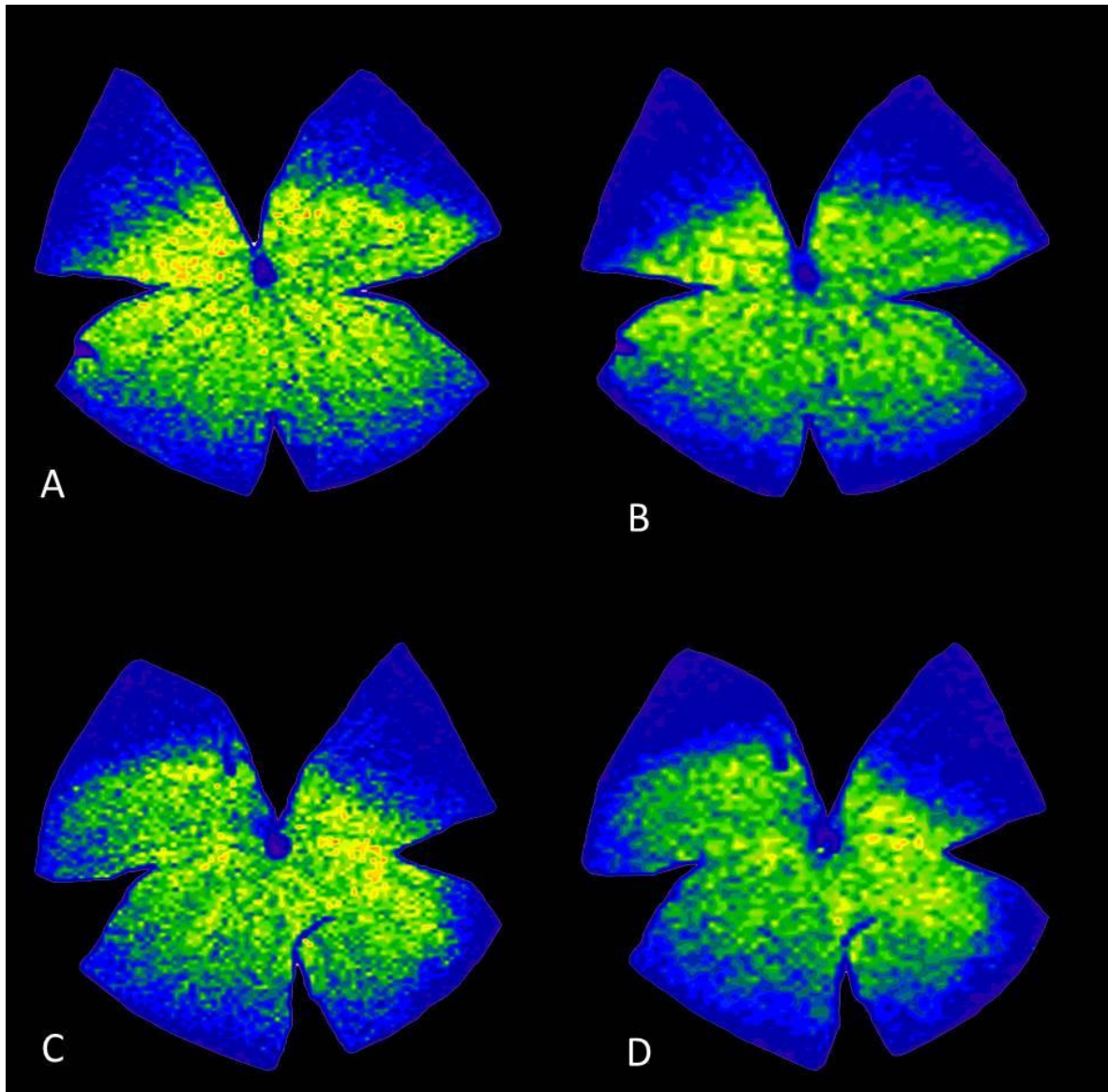


Figura 47. Comparación entre los mapas de isodensidad para las CGR-FG⁺ (A y C) y las CGR-Brn3a⁺ (B y D) de una retina representativa del OD (A y B) y del OS (C y D).

Hemos observado variaciones en el grado de lesión retiniana entre el modelo de glaucoma escogido por nuestro grupo de investigación y el de Vidal-Sanz *et al.* (2012), seguramente asociadas con la distinta magnitud del aumento de la PIO que se consigue con uno u otro modelo.

En el de Vidal-Sanz *et al.* (2012) se consiguió una elevación de la PIO que dobló el valor basal en las primeras 12 horas y que se mantuvo significativamente incrementada tras 3-4 semanas, hasta que disminuyó progresivamente a los valores preoperatorios. Sin embargo, el modelo que hemos reproducido pretende obtener un incremento de PIO moderado y sostenido en el tiempo, que reproduzca en la medida de lo posible la NOG, caracterizada por un comienzo insidioso y una progresión lenta de la enfermedad a lo largo de meses y años. También es importante recordar que entre cada rata existe variabilidad en la severidad del daño retiniano (Levkovitch-Verbin *et al.*, 2002, Vidal-Sanz *et al.*, 2012), por lo que sería recomendable aumentar el número de animales para minimizarla.

Clásicamente se ha aceptado que en la NOG se produce un daño selectivo de las CGR y de sus axones que produce déficits visuales sin afectar al resto de neuronas de la retina. Sin embargo, no todos los investigadores están de acuerdo con que el daño, tanto en las personas como en los modelos animales de experimentación, quede restringido a las CGR (Vidal-Sanz *et al.*, 2012). En medicina humana por ejemplo, hay trabajos que demuestran la pérdida de neuronas también en la CNE (Nork *et al.*, 2000, Choi *et al.*, 2011) y en la CNI (Lei *et al.*, 2008, Lei *et al.*, 2009). Con la intención de comprobar si la hipertensión pudo afectar a las células amacrinias desplazadas además de las CGR, Vidal-Sanz *et al.* (2012) compararon, en varios grupos de retinas sometidas a un incremento de PIO, la población de CGR-Brn3a⁺ con la de núcleos positivos a la tinción DAPI (núcleos-DAPI⁺) presentes en la CCG. Puesto que no se encontraron regiones de la retina desprovistas de núcleos-DAPI⁺, los autores concluyeron que en su modelo de glaucoma se produjo una pérdida selectiva de las CGR, que no afectó al resto de células. Los resultados obtenidos en nuestros ERG confirman la degeneración del segmento externo de la retina, aunque no hemos evidenciado este hecho con técnicas de inmunohistoquímica, por lo que consideramos de gran interés para futuras investigaciones realizar esta comparación.

Detección de apoptosis mediante la técnica TUNEL

Diversos estudios han demostrado que la apoptosis es un mecanismo fundamental de muerte de las CGR en el glaucoma (Hernández, 2000, Morgan *et al.*, 2000). Uno de los métodos más utilizados para estudiar la apoptosis es la técnica TUNEL, descrita por Gavrieli *et al.* (1992).

En nuestro modelo experimental, no hemos conseguido evidenciar apoptosis en las secciones de retina de los grupos control y glaucoma, en ninguno de los 3 laboratorios en los que se realizó la técnica. Puesto que es improbable la ausencia de apoptosis en las CGR, ya que el marcaje

retrógrado con FG y la inmunodetección con Brn3a son altamente sugestivos de muerte de este tipo celular; cabe pensar, pues, que se ha tratado de un problema de penetración o de unión de los reactivos en la muestra por incompatibilidad con el método de conservación de los tejidos en parafina, a pesar de que según las indicaciones del fabricante las muestras de tejidos desparafinados son válidas para realizar la técnica TUNEL. En todo caso las secciones criopreservadas son las de elección para realizar técnicas de inmunofluorescencia, aunque puedan resultar en una peor conservación de la morfología de los tejidos (Chidlow *et al.*, 2011).

Conclusiones

Caracterización funcional, estructural y molecular del modelo de glaucoma crónico experimental basado en la inyección intracamerular de ácido hialurónico en la rata

Conclusiones

De los resultados obtenidos en nuestro estudio podemos deducir las siguientes conclusiones:

1. El tonómetro de aplanamiento Tono-Pen® Vet no ha demostrado ser una herramienta útil para poner de manifiesto las variaciones clínicas de la presión intraocular en la rata despierta, tras inyectar semanalmente ácido hialurónico en la cámara anterior durante un periodo de 10 semanas.
2. El modelo de glaucoma crónico basado en la inyección intracamerular seriada de ácido hialurónico en la rata induce cambios funcionales retinianos, principalmente reflejados en la amplitud de la onda b y en los potenciales oscilatorios.
3. El estudio histopatológico de la retina y nervio óptico tras la inyección seriada de ácido hialurónico en la cámara anterior de la rata no ha conseguido evidenciar las alteraciones citoarquitecturales características del glaucoma crónico.

4. La inmunodetección con Brn3a y el marcaje retrógrado con Fluorogold demuestran la alteración estructural y funcional de las células ganglionares de la retina en el modelo experimental basado en la inyección intracamerular seriada de ácido hialurónico en la rata.
5. El modelo de glaucoma crónico basado en la inyección intracamerular semanal de ácido hialurónico en la rata produce cambios en el perfil metabólico del humor acuoso. De ellos, los hallazgos diferenciales en la expresión de glutamato son sugestivos de citotoxicidad, tal y como está descrito en el glaucoma crónico.
6. El modelo experimental en la rata que se ha desarrollado mediante la inyección intracamerular semanal de ácido hialurónico, ha inducido cambios estructurales, funcionales y moleculares compatibles con las descripciones de glaucoma crónico en los humanos y en roedores, por lo que consideramos que, con algunas modificaciones, resulta un modelo válido de glaucoma crónico experimental.

Futuras líneas de investigación

Caracterización funcional, estructural y molecular del modelo de glaucoma crónico experimental basado en la inyección intracamerular de ácido hialurónico en la rata

Futuras líneas de investigación

Existen evidencias de que el daño glaucomatoso no se limita a estructuras intraoculares sino que se extiende hasta los centros visuales en el cerebro (Bayer *et al.*, 2002). Como futuras líneas de investigación se plantea, con el modelo de glaucoma crónico experimental que hemos caracterizado en este trabajo, poner de manifiesto la relación entre la hipertensión ocular crónica inducida y la progresión de las lesiones de la retina y nervio óptico hasta las áreas visuales de la corteza cerebral.

A tal fin, hemos conservado los cerebros de 20 animales sobre los que se pretende realizar, por un lado, el análisis histopatológico de la arquitectura del córtex cerebral, en concreto del área visual primaria (V1), mediante localización con los mapas topográficos de Paxinos; y por otro, la caracterización morfológica y morfométrica de las neuronas NADPH diaforasa y ONS en dicha área V1.

Resumen

Caracterización funcional, estructural y molecular del modelo de glaucoma crónico experimental basado en la inyección intracamerular de ácido hialurónico en la rata

Resumen

El glaucoma es una enfermedad crónica e irreversible, caracterizada por un aumento de la presión intraocular, que deriva en la degeneración de las células ganglionares retinianas y fibras del nervio óptico, con la consiguiente pérdida de visión (Adatia y Damji, 2005, Morrison *et al.*, 2008). Los modelos animales de glaucoma se constituyen como una herramienta muy útil para el estudio de la etiología de esta enfermedad, así como para entender los mecanismos de formación y eliminación del humor acuoso y el mantenimiento de la presión intraocular. En el presente trabajo de investigación hemos caracterizado un modelo de glaucoma crónico, descrito por Moreno *et al.* (2005), basado en la inyección intracamerular de ácido hialurónico en la rata.

Para ello hemos realizado un estudio prospectivo experimental en 25 ratas (grupo glaucoma experimental) a las que se les inyectó semanalmente ácido hialurónico en la cámara anterior del ojo izquierdo (ojo glaucoma) y suero salino fisiológico en la cámara anterior del ojo derecho (ojo

control) durante un periodo de diez semanas, bajo anestesia general inhalatoria. Antes de la anestesia los animales fueron sometidos a una exploración ocular completa, que incluyó la medición de la presión intraocular con el tonómetro de aplanamiento Tono-Pen® Vet. Para demostrar posibles cambios en la actividad eléctrica de la retina se realizó un estudio electroretinográfico en 15 animales antes de comenzar la fase experimental y a las 5, 7, 9 y 11 semanas, tras 12 horas de adaptación a la oscuridad.

Tras las diez semanas todos los animales fueron eutanasiados y enucleados, y se procedió al análisis histopatológico de la retina y el nervio óptico (n=9), el estudio de la población de células ganglionares de la retina mediante la aplicación del trazador neuronal Fluorogold® (n=5), la inmunodetección del marcador molecular específico Brn3a (n=7) y la detección de apoptosis mediante la técnica TUNEL (n=9). Antes de la eutanasia de los animales, se procedió a la extracción del humor acuoso (n=15) con el fin de valorar el perfil metabólico mediante espectroscopia por resonancia magnética nuclear.

El estudio se completó con un grupo control formado por 5 ratas, cuyos ojos intactos fueron utilizados para estudiar los valores basales de presión intraocular (n=5), el perfil metabólico (n=2), la histología normal de la retina (n=3) y el nervio óptico (n=2), la presencia de células ganglionares apoptóticas en la retina normal (n=3) y el conteo y la distribución de las mismas (n=1).

El análisis estadístico de los datos obtenidos fue realizado con el programa SPSS Statistics® v.17.0 para el sistema operativo Windows, utilizando un nivel de significación del 95%.

Las medidas de presión intraocular obtenidas en la rata despierta con el tonómetro de aplanamiento Tono-Pen® Vet han resultado muy variables a lo largo del experimento. No hemos detectado el incremento clínico de la presión intraocular en el ojo inyectado con ácido hialurónico durante las 10 semanas, al contrario que Moreno *et al.* (2005); además, los valores de presión del ojo glaucoma y el control sólo han mostrado diferencias estadísticamente significativas en la primera semana del experimento. Consideramos que este tonómetro de aplanamiento es poco preciso en la rata, a pesar de que ha sido utilizado y validado en esta especie por otros autores (Moore *et al.*, 1993, Moore *et al.*, 1996, Jia *et al.*, 2000b, Jia *et al.*, 2000a, Benozzi *et al.*, 2002, Goldblum *et al.*, 2002, Moreno *et al.*, 2005).

El estudio electroretinográfico realizado ha demostrado cambios funcionales a nivel de la retina en los ojos inyectados con ácido hialurónico. Así, la amplitud de la onda b y de los potenciales oscilatorios del ojo glaucoma han mostrado una clara tendencia descendente desde el principio del experimento hasta la semana 11, siendo esta reducción estadísticamente

significativa a las 5 semanas, a bajas intensidades de flash, para la amplitud de la onda b y a las 5, 7 y 11 semanas para la amplitud de los potenciales oscilatorios.

El humor acuoso del ojo glaucoma y el control ha presentado diferencias estadísticamente significativas en el perfil de lípidos, proteínas e hidratos de carbono. Cabe destacar que los hallazgos diferenciales en la expresión de glutamato son sugerentes de citotoxicidad, tal y como se describe en el glaucoma crónico (Dreyer *et al.*, 1996, Brooks *et al.*, 1997, Yoles y Schwartz, 1998, Okuno *et al.*, 2006, Doganay *et al.*, 2012).

Las retinas de los ojos control del grupo glaucoma experimental tuvieron una media de CGR-FG⁺ superior a las de los ojos glaucoma, aunque es necesario un mayor número de muestras para realizar el estudio estadístico. Asimismo, la población de CGR identificadas con Brn3a fue significativamente inferior en los ojos izquierdos. Sin embargo, no hemos podido demostrar la presencia de células apoptóticas en las secciones de retina conservadas en parafina.

Los hallazgos histológicos no han evidenciado diferencias estadísticamente significativas entre las retinas de los OD y los OS del grupo glaucoma así como entre los NO. Es probable que este hecho esté relacionado con el procesado de los globos oculares, siendo este aspecto un punto importante a tener en cuenta en futuras investigaciones.

Por todo ello podemos concluir que el modelo experimental de glaucoma en la rata que se ha desarrollado mediante la inyección intracamerular semanal de ácido hialurónico, ha inducido cambios estructurales, funcionales y moleculares compatibles con las descripciones de glaucoma crónico en los humanos y en roedores; consideramos pues que, con ciertas modificaciones, resulta un modelo válido de glaucoma crónico experimental.

Summary

Functional, structural and molecular characterization
of the chronic glaucoma model based on intracameral
hyaluronic acid injection in the rat

Summary

Glaucoma is a chronic, irreversible disease characterized by increased intraocular pressure, which results in the degeneration of retinal ganglion cells and the optic nerve fibers, and therefore loss of vision (Adatia and Damji, 2005, Morrison *et al.*, 2008). Animal models of glaucoma are established as a useful tool for both the study of the disease etiology and to understand the mechanisms of aqueous humor formation and elimination as well as the maintenance of intraocular pressure. In the present investigation we have characterized a chronic glaucoma model in the rat, described by Moreno *et al.* (2005), based on the intracameral injection of hyaluronic acid.

In a prospective study, 25 rats (experimental glaucoma group) were weekly injected into the anterior chamber with hyaluronic acid in the left eye (glaucoma eye) and with saline solution in the right eye (control eye) for ten weeks, under inhalatory anesthesia. A complete eye examination which included the measurement of intraocular pressure with the applanation

tonometer Tono-Pen® Vet, was carried out before anesthesia. To demonstrate possible changes in the electrical activity of the retina, an electroretinographic study was performed in 15 animals before starting the experimental study and at 5, 7, 9 and 11 weeks, in every case after 12 hours of dark adaptation.

Ten weeks later all animals were euthanized and enucleated. Histopathological analysis of the retina and optic nerve (n=9), study of the population of retinal ganglion cells by applying the neuronal tracer Fluorogold® (n=5), immunodetection of the specific molecular marker Brn3a (n=7) and detection of apoptosis by the TUNEL technique (n=9) were performed. In 15 rats, to assess its metabolomic profile by nuclear magnetic resonance spectroscopy, aqueous humor was extracted.

The study was completed with a control group of 5 rats whose eyes were used to study the intraocular pressure (n=5), metabolomic profile (n=2), normal retinal (n=3) and optic nerve (n=2) histology, presence of apoptotic retinal ganglion cells (n=3) and their distribution (n=1).

Statistical analysis of the data was performed with the SPSS Statistics® program v.17.0 for Windows operating system, using a significance level of 95%.

Intraocular pressure measurements obtained with the applanation tonometer Tono-Pen® Vet have been highly variable throughout the experiment. An increase of the intraocular pressure in the glaucoma eye was not detected, in contrast to Moreno *et al.* (2005). The pressure values for the glaucoma and control eyes only showed significant differences in the first week of the experiment. The applanation tonometer Tono-Pen® Vet has been shown to be imprecise in the rat, while having been used and validated in this species by other authors (Moore *et al.*, 1993, Moore *et al.*, 1996, Jia *et al.*, 2000a Jia *et al.*, 2000b, Benozzi *et al.*, 2002, Goldblum *et al.*, 2002, Moreno *et al.*, 2005).

The electroretinographic study revealed functional changes in the retina of eyes injected with hyaluronic acid, with a reduction of both the b wave amplitude and the oscillatory potentials from the beginning of the experiment until week 10. This reduction was statistically significant at 5 weeks at low flash intensities for the b wave amplitude, and at 5, 7 and 11 weeks for the amplitude of oscillatory potentials.

Statistically significant differences in the lipid, protein and carbohydrate profile of the aqueous humor in the glaucoma and control eyes were found. Mainly the differential expression of glutamate is suggestive of cytotoxicity, as described in chronic glaucoma (Dreyer *et al.*, 1996, Brooks *et al.*, 1997, Yoles and Schwartz, 1998, Okuno *et al.*, 2006, Doganay *et al.*, 2012).

The retinas of control eyes showed a higher amount of retinal ganglion cells traced with Fluorogold® compared to glaucoma eyes, although a larger number of samples is needed to carry out a statistical study. Also, the population of retinal ganglion cells identified with Brn3a was significantly lower in the left eyes. However, we were unable to demonstrate the presence of apoptotic cells in paraffin retina sections.

The histological findings have shown no significant statistically differences between the retinas of the right and left eye or between their optic nerves. This might be related to the processing of the eyeballs, this aspect being an important point to be considered in future research.

Therefore, we can conclude that the experimental glaucoma model in the rat which has been developed by weekly intracameral injection of hyaluronic acid has induced structural, functional and molecular changes consistent with chronic glaucoma in both humans and rodents. Thus we consider that, with certain modifications, it is a valid model of experimental chronic glaucoma.

Bibliografía

Caracterización funcional, estructural y molecular del modelo de glaucoma crónico experimental basado en la inyección intracamerular de ácido hialurónico en la rata

Bibliografía

- Acott, T. S., Westcott, M., Passo, M. S., Van Buskirk, E. M. 1985. Trabecular meshwork glycosaminoglycans in human and cynomolgus monkey eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 26: 1320-9.
- Adatia, F. A., Damji, K. F. 2005. Chronic open-angle glaucoma. Review for primary care physicians. *Can Fam Physician*, 51: 1229-37.
- Akiba, S., Mukaida, Y., Hane, K., Oka, M., Uozumi, N., Shimizu, T., Sato, T. 2006. Group IVA phospholipase A2-mediated production of fibronectin by oxidized LDL in mesangial cells. *Kidney Int*, 70: 1013-8.
- Artigas, C., Redondo, J. I., López-Murcia, M. M. 2012. Effects of intravenous administration of dexmedetomidine on intraocular pressure and pupil size in clinically normal dogs. *Vet Ophthalmol*, 15 Suppl 1: 79-82.

- Avilés-Trigueros, M., Mayor-Torroglosa, S., García-Avilés, A., Lafuente, M. P., Rodríguez, M. E., Miralles De Imperial, J., Villegas-Pérez, M. P., Vidal-Sanz, M. 2003. Transient ischemia of the retina results in massive degeneration of the retinotectal projection: long-term neuroprotection with brimonidine. *Exp Neurol*, 184: 767-77.
- Bach, M. 2001. Electrophysiological approaches for early detection of glaucoma. *Eur J Ophthalmol*, 11 Suppl 2: S41-9.
- Bayer, A. U., Cook, P., Brodie, S. E., Maag, K. P., Mittag, T. 2001a. Evaluation of different recording parameters to establish a standard for flash electroretinography in rodents. *Vision Res*, 41: 2173-85.
- Bayer, A. U., Danias, J., Brodie, S., Maag, K. P., Chen, B., Shen, F., Podos, S. M., Mittag, T. W. 2001b. Electroretinographic abnormalities in a rat glaucoma model with chronic elevated intraocular pressure. *Exp Eye Res*, 72: 667-77.
- Bayer, A. U., Neuhardt, T., May, A. C., Martus, P., Maag, K. P., Brodie, S., Lutjen-Drecoll, E., Podos, S. M., Mittag, T. 2001c. Retinal morphology and ERG response in the DBA/2Nnia mouse model of angle-closure glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 42: 1258-65.
- Bayer, A. U., Keller, O. N., Ferrari, F., Maag, K. P. 2002. Association of glaucoma with neurodegenerative diseases with apoptotic cell death: Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Am J Ophthalmol*, 133: 135-7.
- Benozzi, J., Nahum, L. P., Campanelli, J. L., Rosenstein, R. E. 2002. Effect of hyaluronic acid on intraocular pressure in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 43: 2196-200.
- Berardi, N., Domenici, L., Gravina, A., Maffei, L. 1990. Pattern ERG in rats following section of the optic nerve. *Exp Brain Res*, 79: 539-46.
- Berkelaar, M., Clarke, D. B., Wang, Y. C., Bray, G. M., Aguayo, A. J. 1994. Axotomy results in delayed death and apoptosis of retinal ganglion cells in adult rats. *J Neurosci*, 14: 4368-74.
- Bernstein, S. L., Koo, J. H., Slater, B. J., Guo, Y., Margolis, F. L. 2006. Analysis of optic nerve stroke by retinal Bex expression. *Mol Vis*, 12: 147-55.
- Berrueta, L. A., Alonso-Salces, R. M., Heberger, K. 2007. Supervised pattern recognition in food analysis. *J Chromatogr A*, 1158: 196-214.
- Bhattacharya, S. K., Annangudi, S. P., Salomon, R. G., Kuchtey, R. W., Peachey, N. S., Crabb, J. W. 2005a. Cochlin deposits in the trabecular meshwork of the glaucomatous DBA/2J mouse. *Exp Eye Res*, 80: 741-4.
- Bhattacharya, S. K., Peachey, N. S., Crabb, J. W. 2005b. Cochlin and glaucoma: a mini-review. *Vis Neurosci*, 22: 605-13.

- Biermann, J., Van Oterendorp, C., Stoykow, C., Volz, C., Jehle, T., Boehringer, D., Lagreze, W. A. 2012. Evaluation of intraocular pressure elevation in a modified laser-induced glaucoma rat model. *Exp Eye Res*, 104: 7-14.
- Borghini, V., Bastia, E., Guzzetta, M., Chirotti, V., Toris, C. B., Batugo, M. R., Carreiro, S. T., Chong, W. K., Gale, D. C., Kucera, D. J., Jia, L., Prasanna, G., Ongini, E., Krauss, A. H., Impagnatiello, F. 2010. A novel nitric oxide releasing prostaglandin analog, NCX 125, reduces intraocular pressure in rabbit, dog, and primate models of glaucoma. *J Ocul Pharmacol Ther*, 26: 125-32.
- Bringmann, A., Reichenbach, A. 2001. Role of Muller cells in retinal degenerations. *Front Biosci*, 6: E72-92.
- Brooks, D. E., García, G. A., Dreyer, E. B., Zurakowski, D., Franco-Bourland, R. E. 1997. Vitreous body glutamate concentration in dogs with glaucoma. *Am J Vet Res*, 58: 864-7.
- Brown, J. C., Sadler, P. J., Spalton, D. J., Juul, S. M., Macleod, A. F., Sonksen, P. H. 1986. Analysis of human aqueous humour by high resolution ¹H NMR spectroscopy. *Exp Eye Res*, 42: 357-62.
- Buckingham, B. P., Inman, D. M., Lambert, W., Oglesby, E., Calkins, D. J., Steele, M. R., Vetter, M. L., Marsh-Armstrong, N., Horner, P. J. 2008. Progressive ganglion cell degeneration precedes neuronal loss in a mouse model of glaucoma. *J Neurosci*, 28: 2735-44.
- Bui, B. V., Fortune, B. 2004. Ganglion cell contributions to the rat full-field electroretinogram. *J Physiol*, 555: 153-73.
- Bui, B. V., Edmunds, B., Cioffi, G. A., Fortune, B. 2005. The gradient of retinal functional changes during acute intraocular pressure elevation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 46: 202-13.
- Burgoyne, C. F., Downs, J. C., Bellezza, A. J., Suh, J. K., Hart, R. T. 2005. The optic nerve head as a biomechanical structure: a new paradigm for understanding the role of IOP-related stress and strain in the pathophysiology of glaucomatous optic nerve head damage. *Prog Retin Eye Res*, 24: 39-73.
- Buyss, Y. M., Harasymowycz, P., Gaspo, R., Kwok, K., Hutnik, C. M., Blondeau, P., Birt, C. M., Piemontesi, R. L., Gould, L. F., Lesk, M. R., Ahmed, I. K. 2012. Comparison of newly diagnosed ocular hypertension and open-angle glaucoma: ocular variables, risk factors, and disease severity. *J Ophthalmol*, 2012: 757106.
- Carrasco, E., Hernández, C., De Torres, I., Farres, J., Simó, R. 2008. Lowered cortistatin expression is an early event in the human diabetic retina and is associated with apoptosis and glial activation. *Mol Vis*, 14: 1496-502.
- Casson, R. J. 2006. Possible role of excitotoxicity in the pathogenesis of glaucoma. *Clin Experiment Ophthalmol*, 34: 54-63.

- Cohan, B. E., Bohr, D. F. 2001. Goldmann applanation tonometry in the conscious rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 42: 340-2.
- Cole, D. F. 1970. Aqueous and ciliary body. *En: GRAYMORE, C. N. (ed.) Biochemistry Of The Eye*. London: Academic Press, 105-172.
- Crompton, M. 1999. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J*, 341 (Pt 2): 233-49.
- Curcio, C. A., Sloan, K. R., Kalina, R. E., Hendrickson, A. E. 1990. Human photoreceptor topography. *J Comp Neurol*, 292: 497-523.
- Chakravarthy, U., Houston, R. F., Archer, D. B. 1993. Treatment of age-related subfoveal neovascular membranes by teletherapy: a pilot study. *Br J Ophthalmol*, 77: 265-73.
- Chauhan, B. C., Pan, J., Archibald, M. L., Levatte, T. L., Kelly, M. E., Tremblay, F. 2002. Effect of intraocular pressure on optic disc topography, electroretinography, and axonal loss in a chronic pressure-induced rat model of optic nerve damage. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 43: 2969-76.
- Cheunsuang, O., Morris, R. 2005. Astrocytes in the arcuate nucleus and median eminence that take up a fluorescent dye from the circulation express leptin receptors and neuropeptide Y Y1 receptors. *Glia*, 52: 228-33.
- Chidlow, G., Casson, R., Sobrado-Calvo, P., Vidal-Sanz, M., Osborne, N. N. 2005. Measurement of retinal injury in the rat after optic nerve transection: an RT-PCR study. *Mol Vis*, 11: 387-96.
- Chidlow, G., Daymon, M., Wood, J. P., Casson, R. J. 2011. Localization of a wide-ranging panel of antigens in the rat retina by immunohistochemistry: comparison of Davidson's solution and formalin as fixatives. *J Histochem Cytochem*, 59: 884-98.
- Choi, S. S., Zawadzki, R. J., Lim, M. C., Brandt, J. D., Keltner, J. L., Doble, N., Werner, J. S. 2011. Evidence of outer retinal changes in glaucoma patients as revealed by ultrahigh-resolution in vivo retinal imaging. *Br J Ophthalmol*, 95: 131-41.
- Danias, J., Shen, F., Goldblum, D., Chen, B., Ramos-Esteban, J., Podos, S. M., Mittag, T. 2002. Cytoarchitecture of the retinal ganglion cells in the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 43: 587-94.
- Danias, J., Shen, F., Kavalarakis, M., Chen, B., Goldblum, D., Lee, K., Zamora, M. F., Su, Y., Brodie, S. E., Podos, S. M., Mittag, T. 2006. Characterization of retinal damage in the episcleral vein cauterization rat glaucoma model. *Exp Eye Res*, 82: 219-28.
- Dimattio, J. 1989. A comparative study of ascorbic acid entry into aqueous and vitreous humors of the rat and guinea pig. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 30: 2320-31.
- Distelhorst, J. S., Hughes, G. M. 2003. Open-angle glaucoma. *Am Fam Physician*, 67: 1937-44.

- Doganay, S., Cankaya, C., Alkan, A. 2012. Evaluation of corpus geniculatum laterale and vitreous fluid by magnetic resonance spectroscopy in patients with glaucoma; a preliminary study. *Eye (Lond)*, 26: 1044-51.
- Dong, C. J., Agey, P., Hare, W. A. 2004. Origins of the electroretinogram oscillatory potentials in the rabbit retina. *Vis Neurosci*, 21: 533-43.
- Dowling, J. E. 1987. Retinal cells and information processing. En: DOWLING, J. E. (ed.) *The Retina, an approachable part of the brain*. USA: The belknap press of Harvard University press, 12-41.
- Drake, R. L., Vogl, A. W., Mitchell, A. W. M. 2010. Cabeza y cuello. Anatomía regional. Órbita. En: DRAKE, R. L., VOGL, A. W. & MITCHELL, A. W. M. (eds.) *Anatomía de Gray para estudiantes*. Barcelona: Elsevier España, S.L., 878-901.
- Dreher, B., Sefton, A. J., Ni, S. Y., Nisbett, G. 1985. The morphology, number, distribution and central projections of Class I retinal ganglion cells in albino and hooded rats. *Brain Behav Evol*, 26: 10-48.
- Dreyer, E. B., Zurakowski, D., Schumer, R. A., Podos, S. M., Lipton, S. A. 1996. Elevated glutamate levels in the vitreous body of humans and monkeys with glaucoma. *Arch Ophthalmol*, 114: 299-305.
- Duarte, I. F., Barros, A., Almeida, C., Spraul, M., Gil, A. M. 2004. Multivariate analysis of NMR and FTIR data as a potential tool for the quality control of beer. *J Agric Food Chem*, 52: 1031-8.
- Duijm, H. F., Van Den Berg, T. J., Greve, E. L. 1997. Choroidal haemodynamics in glaucoma. *Br J Ophthalmol*, 81: 735-42.
- Ehrlich, J. R., Radcliffe, N. M., Shimmyo, M. 2012. Goldmann applanation tonometry compared with corneal-compensated intraocular pressure in the evaluation of primary open-angle Glaucoma. *BMC Ophthalmol*, 12: 52.
- Ekesten, B. 2007. Ophthalmic examination and diagnostics. Part 4: Electrodiagnostic evaluation of vision. En: GELATT, K. N. (ed.) *Veterinary Ophthalmology*. Fourth ed. Iowa, USA: Blackwell Publishing, 520-535.
- Fileta, J. B., Huang, W., Kwon, G. P., Filippopoulos, T., Ben, Y., Dobberfuhr, A., Grosskreutz, C. L. 2008. Efficient estimation of retinal ganglion cell number: a stereological approach. *J Neurosci Methods*, 170: 1-8.
- Flammer, J. 1994. The vascular concept of glaucoma. *Surv Ophthalmol*, 38 Suppl: S3-6.
- Flammer, J. 2001. [Glaucomatous optic neuropathy: a reperfusion injury]. *Klin Monbl Augenheilkd*, 218: 290-1.

- Flammer, J., Orgul, S., Costa, V. P., Orzalesi, N., Krieglstein, G. K., Serra, L. M., Renard, J. P., Stefansson, E. 2002. The impact of ocular blood flow in glaucoma. *Prog Retin Eye Res*, 21: 359-93.
- Fleming, M. D., Benca, R. M., Behan, M. 2006. Retinal projections to the subcortical visual system in congenic albino and pigmented rats. *Neuroscience*, 143: 895-904.
- Fortune, B., Bui, B. V., Morrison, J. C., Johnson, E. C., Dong, J., Cepurna, W. O., Jia, L., Barber, S., Cioffi, G. A. 2004. Selective ganglion cell functional loss in rats with experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 45: 1854-62.
- Fu, C. T., Sretavan, D. 2010. Laser-induced ocular hypertension in albino CD-1 mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 51: 980-90.
- Fukuda, Y. 1977. A three group classification of rat retinal ganglion cells: Histological and physiological studies. *Brain Res*, 119: 327-344.
- Fukuda, Y., Sugimoto, T., Shirokawa, T. 1982. Strain differences in quantitative analysis of the rat optic nerve. *Exp Neurol*, 75: 525-32.
- Gabelt, B. T., Kaufman, P. L. 2005. Changes in aqueous humor dynamics with age and glaucoma. *Prog Retin Eye Res*, 24: 612-37.
- Galindo-Romero, C., Avilés-Trigueros, M., Jiménez-López, M., Valiente-Soriano, F. J., Salinas-Navarro, M., Nadal-Nicolás, F., Villegas-Pérez, M. P., Vidal-Sanz, M., Agudo-Barriuso, M. 2011. Axotomy-induced retinal ganglion cell death in adult mice: quantitative and topographic time course analyses. *Exp Eye Res*, 92: 377-87.
- García-Valenzuela, E., Shareef, S., Walsh, J., Sharma, S. C. 1995. Programmed cell death of retinal ganglion cells during experimental glaucoma. *Exp Eye Res*, 61: 33-44.
- García, M., Forster, V., Hicks, D., Vecino, E. 2002. Effects of muller glia on cell survival and neuritogenesis in adult porcine retina in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 43: 3735-43.
- García, M., Vecino, E. 2003. [Intracellular pathways leading to apoptosis of retinal cells]. *Arch Soc Esp Oftalmol*, 78: 351-64.
- Gavrieli, Y., Sherman, Y., Ben-Sasson, S. A. 1992. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol*, 119: 493-501.
- Goel, M., Picciani, R. G., Lee, R. K., Bhattacharya, S. K. 2010. Aqueous humor dynamics: a review. *Open Ophthalmol J*, 4: 52-9.
- Goldblum, D., Kontiola, A. I., Mittag, T., Chen, B., Danias, J. 2002. Non-invasive determination of intraocular pressure in the rat eye. Comparison of an electronic tonometer (TonoPen), and a rebound (impact probe) tonometer. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 240: 942-6.
- González, P., Epstein, D. L., Borrás, T. 2000. Genes upregulated in the human trabecular meshwork in response to elevated intraocular pressure. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 41: 352-61.

- Gotch, F. 1903. The time relations of the photoelectric changes on the eyeball of the frog. . *The Journal of Physiology*, 29: 388-416.
- Granit, R. 1933. The components of the retinal action potential in mammals and their relation to the discharge in the optic nerve. *J of Physiol*, 77: 207-239.
- Greiner, J. V., Kopp, S. J., Glonek, T. 1985. Phosphorus nuclear magnetic resonance and ocular metabolism. *Surv Ophthalmol*, 30: 189-202.
- Gribbestad, I. S., Midelfart, A. 1994. High-resolution ¹H NMR spectroscopy of aqueous humour from rabbits. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 232: 494-8.
- Grierson, I., Howes, R. C. 1987. Age-related depletion of the cell population in the human trabecular meshwork. *Eye (Lond)*, 1 (Pt 2): 204-10.
- Grus, F., Sun, D. 2008. Immunological mechanisms in glaucoma. *Semin Immunopathol*, 30: 121-6.
- Gugleta, K., Polunina, A., Kochkorov, A., Waldmann, N., Portmann, N., Katamay, R., Flammer, J., Orgul, S. 2012. Association Between Risk Factors and Glaucomatous Damage in Untreated Primary Open-angle Glaucoma. *J Glaucoma*.
- Guillery, R. W. 2002. On counting and counting errors. *J Comp Neurol*, 447: 1-7.
- Gum, G. G., Gelatt, K. N., Esson, D. W. 2007. Physiology of the eye. *En: GELATT, K. N. (ed.) Veterinary Ophthalmology*. Fourth ed. Iowa, USA: Blackwell Publishing, 149-182.
- Guo, X. Q., Tian, B., Liu, Z. C., Wei, W. B., Tao, Y., Sun, S. J., Zhang, Y. 2011. A new rat model of glaucoma induced by intracameral injection of silicone oil and electrocoagulation of limbal vessels. *Chin Med J (Engl)*, 124: 309-14.
- Haefliger, I. O., Dettmann, E., Liu, R., Meyer, P., Prunte, C., Messerli, J., Flammer, J. 1999. Potential role of nitric oxide and endothelin in the pathogenesis of glaucoma. *Surv Ophthalmol*, 43 Suppl 1: S51-8.
- Hamasaki, D. I., Sato, H., Santhanakrishnan, S., Shinohara, T. 1993. Correlation between the physiologic and morphologic changes in experimental autoimmune uveitis induced by peptide G of S-antigen. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 34: 1861-71.
- Hayreh, S. S. 2001a. Blood flow in the optic nerve head and factors that may influence it. *Prog Retin Eye Res*, 20: 595-624.
- Hayreh, S. S. 2001b. The blood supply of the optic nerve head and the evaluation of it - myth and reality. *Prog Retin Eye Res*, 20: 563-93.
- Hazel, S. J., Thrall, M. A., Severin, G. A., Lauerman, L. H., Jr., Lavach, J. D. 1985. Laboratory evaluation of aqueous humor in the healthy dog, cat, horse, and cow. *Am J Vet Res*, 46: 657-9.
- Hendrix, D. V. H. 2007. Diseases and surgery of the canine anterior uvea. *En: GELATT, K. N. (ed.) Veterinary Ophthalmology*. Fourth ed. Iowa, USA: Blackwell Publishing, 812-858.

- Hernández, M. R. 2000. The optic nerve head in glaucoma: role of astrocytes in tissue remodeling. *Prog Retin Eye Res*, 19: 297-321.
- Herring, I. P. 2007. Clinical pharmacology and therapeutics. Part 3. *En: GELATT, K. N. (ed.) Veterinary Ophthalmology*. Fourth ed. Iowa, USA: Blackwell Publishing, 332-354.
- Honkanen, R. A., Baruah, S., Zimmerman, M. B., Khanna, C. L., Weaver, Y. K., Narkiewicz, J., Waziri, R., Gehrs, K. M., Weingeist, T. A., Boldt, H. C., Folk, J. C., Russell, S. R., Kwon, Y. H. 2003. Vitreous amino acid concentrations in patients with glaucoma undergoing vitrectomy. *Arch Ophthalmol*, 121: 183-8.
- Hu, R. G., Zhu, Y., Donaldson, P., Kalloniatis, M. 2012. Alterations of glutamate, glutamine, and related amino acids in the anterior eye secondary to ischaemia and reperfusion. *Curr Eye Res*, 37: 633-43.
- Hubel, D. H. 2000. El ojo. *En: HUBEL, D. H. (ed.) Ojo, cerebro y visión*. Murcia: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Murcia, 33-58.
- Infeld, D. A., O'shea, J. G. 1998. Glaucoma: diagnosis and management. *Postgrad Med J*, 74: 709-15.
- Jacobson, M. D., Weil, M., Raff, M. C. 1997. Programmed cell death in animal development. *Cell*, 88: 347-54.
- Jain, A. K., Duin, R. P. W., Mao, J. 2000. Statistical Pattern Recognition: A Review. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, 22: 4-37.
- Jeffery, G. 1985. The relationship between cell density and the nasotemporal division in the rat retina. *Brain Res*, 347: 354-7.
- Jia, L., Cepurna, W. O., Johnson, E. C., Morrison, J. C. 2000a. Patterns of intraocular pressure elevation after aqueous humor outflow obstruction in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 41: 1380-5.
- Jia, L., Cepurna, W. O., Johnson, E. C., Morrison, J. C. 2000b. Effect of general anesthetics on IOP in rats with experimental aqueous outflow obstruction. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 41: 3415-9.
- Johnson, S. A., You, Z., Hunter, T. 2007. Monitoring ATM kinase activity in living cells. *DNA Repair (Amst)*, 6: 1277-84.
- Johnson, T. V., Tomarev, S. I. 2010. Rodent models of glaucoma. *Brain Res Bull*, 81: 349-58.
- Jonas, J. B., Schmidt, A. M., Muller-Bergh, J. A., Naumann, G. O. 1995. Optic nerve fiber count and diameter of the retrobulbar optic nerve in normal and glaucomatous eyes. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 233: 421-4.

- Jovanovic, P., Zoric, L., Stefanovic, I., Dzunic, B., Djordjevic-Jocic, J., Radenkovic, M., Jovanovic, M. 2010. Lactate dehydrogenase and oxidative stress activity in primary open-angle glaucoma aqueous humour. *Bosn J Basic Med Sci*, 10: 83-8.
- Kaddurah-Daouk, R., Kristal, B. S., Weinshilboum, R. M. 2008. Metabolomics: a global biochemical approach to drug response and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 48: 653-83.
- Kallberg, M. E., Brooks, D. E., Gelatt, K. N., García-Sánchez, G. A., Szabo, N. J., Lambrou, G. N. 2007. Endothelin-1, nitric oxide, and glutamate in the normal and glaucomatous dog eye. *Vet Ophthalmol*, 10 Suppl 1: 46-52.
- Kanski, J. J. 2007. Glaucoma. En: KANSKI, J. J. (ed.) *Clinical Ophthalmology. A Systematic Approach*. Sixth ed. Philadelphia, USA: Elsevier, 371-439.
- Kawasaki, A., Otori, Y., Barnstable, C. J. 2000. Muller cell protection of rat retinal ganglion cells from glutamate and nitric oxide neurotoxicity. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 41: 3444-50.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., Currie, A. R. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26: 239-57.
- Khaw, P. T., Shah, P., Elkington, A. R. 2004a. Glaucoma--1: diagnosis. *BMJ*, 328: 97-9.
- Khaw, P. T., Shah, P., Elkington, A. R. 2004b. Glaucoma--2: treatment. *BMJ*, 328: 156-8.
- Kim, H. G., Park, J. W., Park, S. W. 2012. Experimental chronic ocular hypertension by anterior chamber injection of 0.3% carbomer solution in the rat. *Clin Experiment Ophthalmol*.
- Knepper, P. A., Goossens, W., Hvizd, M., Palmberg, P. F. 1996. Glycosaminoglycans of the human trabecular meshwork in primary open-angle glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 37: 1360-7.
- Ko, M. L., Hu, D. N., Ritch, R., Sharma, S. C., Chen, C. F. 2001. Patterns of retinal ganglion cell survival after brain-derived neurotrophic factor administration in hypertensive eyes of rats. *Neurosci Lett*, 305: 139-42.
- Kontiola, A. I., Goldblum, D., Mittag, T., Danias, J. 2001. The induction/impact tonometer: a new instrument to measure intraocular pressure in the rat. *Exp Eye Res*, 73: 781-5.
- Korth, M. 1997. The value of electrophysiological testing in glaucomatous diseases. *J Glaucoma*, 6: 331-43.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Brenner, C. 2007. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev*, 87: 99-163.
- Lafuente, M. P., Villegas-Pérez, M. P., Sellés-Navarro, I., Mayor-Torroglosa, S., Miralles De Imperial, J., Vidal-Sanz, M. 2002. Retinal ganglion cell death after acute retinal ischemia is an ongoing process whose severity and duration depends on the duration of the insult. *Neuroscience*, 109: 157-68.

- Laquis, S., Chaudhary, P., Sharma, S. C. 1998. The patterns of retinal ganglion cell death in hypertensive eyes. *Brain Res*, 784: 100-4.
- Le, A., Mukesh, B. N., Mccarty, C. A., Taylor, H. R. 2003. Risk factors associated with the incidence of open-angle glaucoma: the visual impairment project. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 44: 3783-9.
- Lei, Y., Garrahan, N., Hermann, B., Becker, D. L., Hernández, M. R., Boulton, M. E., Morgan, J. E. 2008. Quantification of retinal transneuronal degeneration in human glaucoma: a novel multiphoton-DAPI approach. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 49: 1940-5.
- Lei, Y., Garrahan, N., Hermann, B., Fautsch, M. P., Johnson, D. H., Hernandez, M. R., Boulton, M., Morgan, J. E. 2009. Topography of neuron loss in the retinal ganglion cell layer in human glaucoma. *Br J Ophthalmol*, 93: 1676-9.
- Leiva, M., Naranjo, C., Pena, M. T. 2006. Comparison of the rebound tonometer (iCare) to the applanation tonometer (Tonopen XL) in normotensive dogs. *Vet Ophthalmol*, 9: 17-21.
- Levin, L. A., Peeples, P. 2008. History of neuroprotection and rationale as a therapy for glaucoma. *Am J Manag Care*, 14: S11-4.
- Levkovitch-Verbin, H., Quigley, H. A., Martin, K. R., Valenta, D., Baumrind, L. A., Pease, M. E. 2002. Translimbal laser photocoagulation to the trabecular meshwork as a model of glaucoma in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 43: 402-10.
- Lewis, G. D., Asnani, A., Gerszten, R. E. 2008. Application of metabolomics to cardiovascular biomarker and pathway discovery. *J Am Coll Cardiol*, 52: 117-23.
- Liu, B., Neufeld, A. H. 2000. Expression of nitric oxide synthase-2 (NOS-2) in reactive astrocytes of the human glaucomatous optic nerve head. *Glia*, 30: 178-86.
- Liu, K., Akula, J. D., Hansen, R. M., Moskowitz, A., Kleinman, M. S., Fulton, A. B. 2006. Development of the electroretinographic oscillatory potentials in normal and ROP rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 47: 5447-52.
- Loyo-Berríos, N. I., Blustein, J. N. 2007. Primary-open glaucoma and myopia: a narrative review. *WMJ*, 106: 85-9, 95.
- Mabuchi, F., Aihara, M., Mackey, M. R., Lindsey, J. D., Weinreb, R. N. 2003. Optic nerve damage in experimental mouse ocular hypertension. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 44: 4321-30.
- Mabuchi, F., Aihara, M., Mackey, M. R., Lindsey, J. D., Weinreb, R. N. 2004. Regional optic nerve damage in experimental mouse glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 45: 4352-8.
- Macknight, A. D., Mclaughlin, C. W., Peart, D., Purves, R. D., Carre, D. A., Civan, M. M. 2000. Formation of the aqueous humor. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 27: 100-6.
- Mckerracher, L., Vallee, R. B., Aguayo, A. J. 1989. Microtubule-associated protein 1A (MAP 1A) is a ganglion cell marker in adult rat retina. *Vis Neurosci*, 2: 349-56.

- Mermoud, A., Baerveldt, G., Minckler, D. S., Lee, M. B., Rao, N. A. 1994. Intraocular pressure in Lewis rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 35: 2455-60.
- Mermoud, A., Baerveldt, G., Minckler, D. S., Prata, J. A., Jr., Rao, N. A. 1996. Aqueous humor dynamics in rats. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 234 Suppl 1: S198-203.
- Midelfart, A., Dybdahl, A., Gribbestad, I. S. 1996a. Metabolic analysis of the rabbit cornea by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Ophthalmic Res*, 28: 319-29.
- Midelfart, A., Dybdahl, A., Gribbestad, S. 1996b. Detection of different metabolites in the rabbit lens by high resolution ^1H NMR spectroscopy. *Curr Eye Res*, 15: 1175-81.
- Midelfart, A., Gribbestad, I. S., Knutsen, B. H., Jorgensen, L. 1996c. Detection of metabolites in aqueous humour from cod eye by high resolution H^1 NMR spectroscopy. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol*, 113B: 445-450.
- Midelfart, A., Dybdahl, A., N, M. U., Sitter, B., Gribbestad, I. S., Krane, J. 1998. Dexamethasone and dexamethasone phosphate detected by ^1H and ^{19}F NMR spectroscopy in the aqueous humour. *Exp Eye Res*, 66: 327-37.
- Midelfart, A. 2009. Metabonomics--a new approach in ophthalmology. *Acta Ophthalmol*, 87: 697-703.
- Mittag, T. W., Danias, J., Pohorenc, G., Yuan, H. M., Burakgazi, E., Chalmers-Redman, R., Podos, S. M., Tatton, W. G. 2000. Retinal damage after 3 to 4 months of elevated intraocular pressure in a rat glaucoma model. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 41: 3451-9.
- Monemi, S., Spaeth, G., Dasilva, A., Popinchalk, S., Ilitchev, E., Liebmann, J., Ritch, R., Heon, E., Crick, R. P., Child, A., Sarfarazi, M. 2005. Identification of a novel adult-onset primary open-angle glaucoma (POAG) gene on 5q22.1. *Hum Mol Genet*, 14: 725-33.
- Moore, C. G., Milne, S. T., Morrison, J. C. 1993. Noninvasive measurement of rat intraocular pressure with the Tono-Pen. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 34: 363-9.
- Moore, C. G., Johnson, E. C., Morrison, J. C. 1996. Circadian rhythm of intraocular pressure in the rat. *Curr Eye Res*, 15: 185-91.
- Moreno, M. C., Marcos, H. J., Oscar Croxatto, J., Sande, P. H., Campanelli, J., Jaliffa, C. O., Benozzi, J., Rosenstein, R. E. 2005. A new experimental model of glaucoma in rats through intracameral injections of hyaluronic acid. *Exp Eye Res*, 81: 71-80.
- Morgan, J. E., Uchida, H., Caprioli, J. 2000. Retinal ganglion cell death in experimental glaucoma. *Br J Ophthalmol*, 84: 303-10.
- Morrison, J. C. 2005. Elevated intraocular pressure and optic nerve injury models in the rat. *J Glaucoma*, 14: 315-7.
- Morrison, J. C., Johnson, E., Cepurna, W. O. 2008. Rat models for glaucoma research. *Prog Brain Res*, 173: 285-301.

- Nadal-Nicolás, F. M., Jiménez-López, M., Sobrado-Calvo, P., Nieto-López, L., Canovas-Martínez, I., Salinas-Navarro, M., Vidal-Sanz, M., Agudo, M. 2009. Brn3a as a marker of retinal ganglion cells: qualitative and quantitative time course studies in naive and optic nerve-injured retinas. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 50: 3860-8.
- Nadal-Nicolás, F. M., Jiménez-López, M., Salinas-Navarro, M., Sobrado-Calvo, P., Albuquerque-Bejar, J. J., Vidal-Sanz, M., Agudo-Barriuso, M. 2012. Whole number, distribution and co-expression of brn3 transcription factors in retinal ganglion cells of adult albino and pigmented rats. *PLoS One*, 7: e49830.
- Nagata, N., Yuki, M., Hasegawa, T. 2011. In vitro and in vivo comparison of applanation tonometry and rebound tonometry in dogs. *J Vet Med Sci*, 73: 1585-9.
- Nickells, R. W. 2004. The molecular biology of retinal ganglion cell death: caveats and controversies. *Brain Res Bull*, 62: 439-46.
- Nicholson, J. K., O'flynn, M. P., Sadler, P. J., Macleod, A. F., Juul, S. M., Sonksen, P. H. 1984. Proton-nuclear-magnetic-resonance studies of serum, plasma and urine from fasting normal and diabetic subjects. *Biochem J*, 217: 365-75.
- Nicholson, J. K., Lindon, J. C., Holmes, E. 1999. 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica*, 29: 1181-9.
- Nicholls, D., Attwell, D. 1990. The release and uptake of excitatory amino acids. *Trends Pharmacol Sci*, 11: 462-8.
- Nork, T. M., Ver Hoeve, J. N., Poulsen, G. L., Nickells, R. W., Davis, M. D., Weber, A. J., Vaegan, Sarks, S. H., Lemley, H. L., Millecchia, L. L. 2000. Swelling and loss of photoreceptors in chronic human and experimental glaucomas. *Arch Ophthalmol*, 118: 235-45.
- Okuno, T., Oku, H., Sugiyama, T., Ikeda, T. 2006. Glutamate level in optic nerve head is increased by artificial elevation of intraocular pressure in rabbits. *Exp Eye Res*, 82: 465-70.
- Ollivier, F. J., Plummer, C. E., Barrie, K. P. 2007. Ophthalmic examination and diagnostics. Part 1: The eye examination and diagnostic procedures. En: GELATT, K. N. (ed.) *Veterinary Ophthalmology*. Fourth ed. Iowa, USA: Blackwell Publishing, 438-483.
- Osborne, N. N., Wood, J. P., Chidlow, G., Bae, J. H., Melena, J., Nash, M. S. 1999. Ganglion cell death in glaucoma: what do we really know? *Br J Ophthalmol*, 83: 980-6.
- Park, S. C., Lee, D. H., Lee, H. J., Kee, C. 2009. Risk factors for normal-tension glaucoma among subgroups of patients. *Arch Ophthalmol*, 127: 1275-83.
- Parry, H. B., Tansley, K., Thomson, L. C. 1953. The electroretinogram of the dog. *J Physiol*, 120: 28-40.

- Pereira, F. Q., Bercht, B. S., Soares, M. G., Da Mota, M. G., Pigatto, J. A. 2011. Comparison of a rebound and an applanation tonometer for measuring intraocular pressure in normal rabbits. *Vet Ophthalmol*, 14: 321-6.
- Perlman, I. 2001. The Electroretinogram: ERG. In: KOLB H, F. E., NELSON R, EDITORS. (ed.) *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System*. Salt Lake City (UT): University of Utah Health Sciences Center.
- Perry, V. H. 1979. The ganglion cell layer of the retina of the rat: a Golgi study. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 204: 363-75.
- Perry, V. H. 1981. Evidence for an amacrine cell system in the ganglion cell layer of the rat retina. *Neuroscience*, 6: 931-44.
- Perry, V. H., Henderson, Z., Linden, R. 1983. Postnatal changes in retinal ganglion cell and optic axon populations in the pigmented rat. *J Comp Neurol*, 219: 356-68.
- Pinazo-Durán, M. D., Renau-Piqueras, J., Guerri, C. 1993. Developmental changes in the optic nerve related to ethanol consumption in pregnant rats: analysis of the ethanol-exposed optic nerve. *Teratology*, 48: 305-22.
- Pinazo-Durán, M. D., Renau-Piqueras, J., Guerri, C., Stromland, K. 1997. Optic nerve hypoplasia in fetal alcohol syndrome: an update. *Eur J Ophthalmol*, 7: 262-70.
- Pinazo-Durán, M. D. 2002. [State-of-the-art in ocular malformations. Human and animal model studies]. *Arch Soc Esp Oftalmol*, 77: 473-6.
- Pinazo-Durán, M. D., Pons-Vázquez, S., Gallego-Pinazo, R., Galbis Estrada, C., Zanón-Moreno, V., Vila Bou, V., Sanz Solana, P. 2011. Thyroid hormone deficiency disrupts rat eye neurodevelopment. *Brain Res*, 1392: 16-26.
- Pinazo-Durán, M. D. 2012. [Genetics, and something else]. *Arch Soc Esp Oftalmol*, 87: 35-7.
- Pons-Vázquez, S., Vila-Bou, V., Zanón-Moreno, V., Iborra, F. J., Gallego-Pinazo, R., Melo, P. M., García-Medina, J. J., Pinazo-Durán, M. D. 2008. [Study of apoptosis and mitosis mechanisms in the eye. Experimental model of gestational toxic syndrome]. *Arch Soc Esp Oftalmol*, 83: 37-44.
- Quigley, H. A., Nickells, R. W., Kerrigan, L. A., Pease, M. E., Thibault, D. J., Zack, D. J. 1995. Retinal ganglion cell death in experimental glaucoma and after axotomy occurs by apoptosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 36: 774-86.
- Quigley, H. A., Broman, A. T. 2006. The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. *Br J Ophthalmol*, 90: 262-7.
- Quinn, R. H., Miller, S. S. 1992. Ion transport mechanisms in native human retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 33: 3513-27.

- Quintyn, J. C., Ranty, M. L., Mathis, A. 2006. Photoreceptor apoptosis in human retinal detachment. *Am J Ophthalmol*, 141: 227; author reply 227-8.
- Ramírez, A. I., Salazar, J. J., De Hoz, R., Rojas, B., Gallego, B. I., Salinas-Navarro, M., Alarcón-Martínez, L., Ortín-Martínez, A., Avilés-Trigueros, M., Vidal-Sanz, M., Trivino, A., Ramírez, J. M. 2010. Quantification of the effect of different levels of IOP in the astroglia of the rat retina ipsilateral and contralateral to experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 51: 5690-6.
- Ramírez, J. M., Trivino, A., Ramírez, A. I., Salazar, J. J., García-Sánchez, J. 1996. Structural specializations of human retinal glial cells. *Vision Res*, 36: 2029-36.
- Ramírez, J. M., Ramírez, A. I., Salazar, J. J., De Hoz, R., Trivino, A. 2001. Changes of astrocytes in retinal ageing and age-related macular degeneration. *Exp Eye Res*, 73: 601-15.
- Ray, K., Mookherjee, S. 2009. Molecular complexity of primary open angle glaucoma: current concepts. *J Genet*, 88: 451-67.
- Razeghinejad, M. R., Katz, L. J. 2012. Steroid-induced iatrogenic glaucoma. *Ophthalmic Res*, 47: 66-80.
- Reiss, G. R., Werness, P. G., Zollman, P. E., Brubaker, R. F. 1986. Ascorbic acid levels in the aqueous humor of nocturnal and diurnal mammals. *Arch Ophthalmol*, 104: 753-5.
- Riley, M. U. 1972. Intraocular dynamics of lactic acid in the rabbit. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 11: 600.
- Ringvold, A., Anderssen, E., Kjonniksen, I. 2000. Distribution of ascorbate in the anterior bovine eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 41: 20-3.
- Risa, O., Saether, O., Lofgren, S., Soderberg, P. G., Krane, J., Midelfart, A. 2004. Metabolic changes in rat lens after in vivo exposure to ultraviolet irradiation: measurements by high resolution MAS 1H NMR spectroscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 45: 1916-21.
- Robson, J. G., Saszik, S. M., Ahmed, J., Frishman, L. J. 2003. Rod and cone contributions to the a-wave of the electroretinogram of the macaque. *J Physiol*, 547: 509-30.
- Rose, R. C., Bode, A. M. 1991. Ocular ascorbate transport and metabolism. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol*, 100: 273-85.
- Rosolen, S. G., Rigaudiere, F., Le Gargasson, J. F., Brigell, M. G. 2005. Recommendations for a toxicological screening ERG procedure in laboratory animals. *Doc Ophthalmol*, 110: 57-66.
- Ruiz-Ederra, J., García, M., Hernández, M., Úrcola, H., Hernández-Barbachano, E., Araiz, J., Vecino, E. 2005. The pig eye as a novel model of glaucoma. *Exp Eye Res*, 81: 561-9.
- Saeki, T., Aihara, M., Ohashi, M., Araie, M. 2008. The efficacy of TonoLab in detecting physiological and pharmacological changes of mouse intraocular pressure--comparison with TonoPen and microneedle manometry. *Curr Eye Res*, 33: 247-52.

- Sagdullaev, B. T., Demarco, P. J., McCall, M. A. 2004. Improved contact lens electrode for corneal ERG recordings in mice. *Doc Ophthalmol*, 108: 181-4.
- Salinas-Navarro, M., Mayor-Torroglosa, S., Jiménez-López, M., Avilés-Trigueros, M., Holmes, T. M., Lund, R. D., Villegas-Pérez, M. P., Vidal-Sanz, M. 2009. A computerized analysis of the entire retinal ganglion cell population and its spatial distribution in adult rats. *Vision Res*, 49: 115-26.
- Salinas-Navarro, M., Alarcón-Martínez, L., Valiente-Soriano, F. J., Jiménez-López, M., Mayor-Torroglosa, S., Avilés-Trigueros, M., Villegas-Pérez, M. P., Vidal-Sanz, M. 2010. Ocular hypertension impairs optic nerve axonal transport leading to progressive retinal ganglion cell degeneration. *Exp Eye Res*, 90: 168-83.
- Salinas-Navarro, M. A. 2011. *Efecto de la hipertensión ocular en la población de células ganglionares de la retina en rata y ratón*. Facultad de Medicina, Universidad de Murcia.
- Samsel, P. A., Kisiswa, L., Erichsen, J. T., Cross, S. D., Morgan, J. E. 2011. A novel method for the induction of experimental glaucoma using magnetic microspheres. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 52: 1671-5.
- Samuelson, D. A. 2007. Ophthalmic anatomy. En: GELATT, K. N. (ed.) *Veterinary Ophthalmology*. Fourth ed. Iowa, USA: Blackwell Publishing, 37-148.
- Sappington, R. M., Carlson, B. J., Crish, S. D., Calkins, D. J. 2010. The microbead occlusion model: a paradigm for induced ocular hypertension in rats and mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 51: 207-16.
- Sato, T., Roy, S. 2002. Effect of high glucose on fibronectin expression and cell proliferation in trabecular meshwork cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 43: 170-5.
- Schmued, L. C., Fallon, J. H. 1986. Fluoro-Gold: a new fluorescent retrograde axonal tracer with numerous unique properties. *Brain Res*, 377: 147-54.
- Schurr, A. 2002. Lactate, glucose and energy metabolism in the ischemic brain (Review). *Int J Mol Med*, 10: 131-6.
- Sefton, A. J., Dreher, B., Harvey, A. 2004. Visual system. En: PAXINOS, G. (ed.) *The rat nervous system*. Third ed. California, USA: Elsevier, 1082-1121.
- Sellés-Navarro, I., Villegas-Pérez, M. P., Salvador-Silva, M., Ruiz-Gómez, J. M., Vidal-Sanz, M. 1996. Retinal ganglion cell death after different transient periods of pressure-induced ischemia and survival intervals. A quantitative in vivo study. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 37: 2002-14.
- Senin, I., Bosch, L., Ramon, E., Zernii, E. Y., Manyosa, J., Philippov, P. P., Garriga, P. 2006. Ca²⁺/recoverin dependent regulation of phosphorylation of the rhodopsin mutant R135L associated with retinitis pigmentosa. *Biochem Biophys Res Commun*, 349: 345-52.

- Shareef, S. R., García-Valenzuela, E., Salierno, A., Walsh, J., Sharma, S. C. 1995. Chronic ocular hypertension following episcleral venous occlusion in rats. *Exp Eye Res*, 61: 379-82.
- Sieving, P. A., Frishman, L. J., Steinberg, R. H. 1986. Scotopic threshold response of proximal retina in cat. *J Neurophysiol*, 56: 1049-61.
- Sieving, P. A., Nino, C. 1988. Scotopic threshold response (STR) of the human electroretinogram. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 29: 1608-14.
- Silva, F. R., Vidotti, V. G., Cremasco, F., Dias, M., Gomi, E. S., Costa, V. P. 2013. Sensitivity and specificity of machine learning classifiers for glaucoma diagnosis using Spectral Domain OCT and standard automated perimetry. *Arq Bras Oftalmol*, 76: 170-4.
- Silveira, L. C., Picanco-Diniz, C. W., Oswaldo-Cruz, E. 1989. Distribution and size of ganglion cells in the retinae of large Amazon rodents. *Vis Neurosci*, 2: 221-35.
- Siu, A. W., Leung, M. C., To, C. H., Siu, F. K., Ji, J. Z., So, K. F. 2002. Total retinal nitric oxide production is increased in intraocular pressure-elevated rats. *Exp Eye Res*, 75: 401-6.
- Song, Z., Gong, Y., Liu, H., Ren, Q., Sun, X. 2011. Glycyrrhizin could reduce ocular hypertension induced by triamcinolone acetonide in rabbits. *Mol Vis*, 17: 2056-64.
- Spalton, D. J., Marshall, J. 1995. La retina normal. En: SPALTON, D. J., HITCHINGS, R. A. & HUNTER, P. A. (eds.) *Atlas de Oftalmología Clínica*. Londres: Mosby, 2-9.
- Srivatsa, G. S., Chan, M. F., Chien, D. S., Tobias, B. 1991. Detection and identification of endogenous small molecules in ocular tissues by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Curr Eye Res*, 10: 127-32.
- Stewart, W. C., Kolker, A. E., Sharpe, E. D., Day, D. G., Holmes, K. T., Leech, J. N., Johnson, M., Cantrell, J. B. 2000. Factors associated with long-term progression or stability in primary open-angle glaucoma. *Am J Ophthalmol*, 130: 274-9.
- Strömland, K., Pinazo-Durán, M. D. 1994. Optic nerve hypoplasia: comparative effects in children and rats exposed to alcohol during pregnancy. *Teratology*, 50: 100-11.
- Strömland, K., Pinazo-Durán, M. D. 2002. Ophthalmic involvement in the fetal alcohol syndrome: clinical and animal model studies. *Alcohol Alcohol*, 37: 2-8.
- Surgucheva, I., Shestopalov, V. I., Surguchov, A. 2008a. Effect of gamma-synuclein silencing on apoptotic pathways in retinal ganglion cells. *J Biol Chem*, 283: 36377-85.
- Surgucheva, I., Weisman, A. D., Goldberg, J. L., Shnyra, A., Surguchov, A. 2008b. Gamma-synuclein as a marker of retinal ganglion cells. *Mol Vis*, 14: 1540-8.
- Svenneby, G., Torgner, I. A. 1987. Localization and function of glutamine synthetase and glutaminase. *Biochem Soc Trans*, 15: 213-5.
- Takahata, K., Katsuki, H., Kume, T., Nakata, D., Ito, K., Muraoka, S., Yoneda, F., Kashii, S., Honda, Y., Akaike, A. 2003. Retinal neuronal death induced by intraocular administration of a nitric

- oxide donor and its rescue by neurotrophic factors in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 44: 1760-6.
- Tessem, M. B., Bathen, T. F., Cejkova, J., Midelfart, A. 2005. Effect of UV-A and UV-B irradiation on the metabolic profile of aqueous humor in rabbits analyzed by ¹H NMR spectroscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 46: 776-81.
- Tezel, G., Hernández, M. R., Wax, M. B. 2001a. In vitro evaluation of reactive astrocyte migration, a component of tissue remodeling in glaucomatous optic nerve head. *Glia*, 34: 178-89.
- Tezel, G., Li, L. Y., Patil, R. V., Wax, M. B. 2001b. TNF-alpha and TNF-alpha receptor-1 in the retina of normal and glaucomatous eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 42: 1787-94.
- Tezel, G., Yang, X., Luo, C., Peng, Y., Sun, S. L., Sun, D. 2007. Mechanisms of immune system activation in glaucoma: oxidative stress-stimulated antigen presentation by the retina and optic nerve head glia. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 48: 705-14.
- Tezel, G. 2009. The role of glia, mitochondria, and the immune system in glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 50: 1001-12.
- Tkadlecova, M., Havlíček, J., Volka, K., Soucek, P., Karel, I. 1999. Study of aqueous humour by ¹H NMR spectroscopy. *J Mol Struct*, 480-481: 601-605.
- To, C. H., Kong, C. W., Chan, C. Y., Shahidullah, M., Do, C. W. 2002. The mechanism of aqueous humour formation. *Clin Exp Optom*, 85: 335-49.
- Toda, N., Nakanishi-Toda, M. 2007. Nitric oxide: ocular blood flow, glaucoma, and diabetic retinopathy. *Prog Retin Eye Res*, 26: 205-38.
- Trygg, J., Holmes, E., Lundstedt, T. 2007. Chemometrics in metabonomics. *J Proteome Res*, 6: 469-79.
- Ueda, J., Sawaguchi, S., Hanyu, T., Yaoeda, K., Fukuchi, T., Abe, H., Ozawa, H. 1998. Experimental glaucoma model in the rat induced by laser trabecular photocoagulation after an intracameral injection of India ink. *Jpn J Ophthalmol*, 42: 337-44.
- Úrcola, J. H., Hernández, M., Vecino, E. 2006. Three experimental glaucoma models in rats: comparison of the effects of intraocular pressure elevation on retinal ganglion cell size and death. *Exp Eye Res*, 83: 429-37.
- Varma, R., Peeples, P., Walt, J. G., Bramley, T. J. 2008. Disease progression and the need for neuroprotection in glaucoma management. *Am J Manag Care*, 14: S15-9.
- Vecino, E. 2008. [Animal models in the study of the glaucoma: past, present and future]. *Arch Soc Esp Oftalmol*, 83: 517-9.
- Velten, I. M., Horn, F. K., Korth, M., Velten, K. 2001a. The b-wave of the dark adapted flash electroretinogram in patients with advanced asymmetrical glaucoma and normal subjects. *Br J Ophthalmol*, 85: 403-9.

- Velten, I. M., Korth, M., Horn, F. K. 2001b. The a-wave of the dark adapted electroretinogram in glaucomas: are photoreceptors affected? *Br J Ophthalmol*, 85: 397-402.
- Vidal-Sanz, M., Villegas-Pérez, M. P., Bray, G. M., Aguayo, A. J. 1988. Persistent retrograde labeling of adult rat retinal ganglion cells with the carbocyanine dye dil. *Exp Neurol*, 102: 92-101.
- Vidal-Sanz, M., Lafuente, M., Sobrado-Calvo, P., Sellés-Navarro, I., Rodríguez, E., Mayor-Torroglosa, S., Villegas-Pérez, M. P. 2000. Death and neuroprotection of retinal ganglion cells after different types of injury. *Neurotox Res*, 2: 215-27.
- Vidal-Sanz, M., Lafuente, M. P., Mayor, S., De Imperial, J. M., Villegas-Pérez, M. P. 2001. Retinal ganglion cell death induced by retinal ischemia. neuroprotective effects of two alpha-2 agonists. *Surv Ophthalmol*, 45 Suppl 3: S261-7; discussion S273-6.
- Vidal-Sanz, M., Salinas-Navarro, M., Nadal-Nicolás, F. M., Alarcón-Martínez, L., Valiente-Soriano, F. J., De Imperial, J. M., Avilés-Trigueros, M., Agudo-Barriuso, M., Villegas-Pérez, M. P. 2012. Understanding glaucomatous damage: anatomical and functional data from ocular hypertensive rodent retinas. *Prog Retin Eye Res*, 31: 1-27.
- Villegas-Pérez, M. P., Lawrence, J. M., Vidal-Sanz, M., Lavail, M. M., Lund, R. D. 1998. Ganglion cell loss in RCS rat retina: a result of compression of axons by contracting intraretinal vessels linked to the pigment epithelium. *J Comp Neurol*, 392: 58-77.
- Wachtmeister, L. 1998. Oscillatory potentials in the retina: what do they reveal. *Prog Retin Eye Res*, 17: 485-521.
- Wang, S., Villegas-Pérez, M. P., Holmes, T., Lawrence, J. M., Vidal-Sanz, M., Hurtado-Montalban, N., Lund, R. D. 2003. Evolving neurovascular relationships in the RCS rat with age. *Curr Eye Res*, 27: 183-96.
- Wang, S. W., Mu, X., Bowers, W. J., Kim, D. S., Plas, D. J., Crair, M. C., Federoff, H. J., Gan, L., Klein, W. H. 2002. Brn3b/Brn3c double knockout mice reveal an unsuspected role for Brn3c in retinal ganglion cell axon outgrowth. *Development*, 129: 467-77.
- Wang, W. H., Millar, J. C., Pang, I. H., Wax, M. B., Clark, A. F. 2005. Noninvasive measurement of rodent intraocular pressure with a rebound tonometer. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 46: 4617-21.
- Weinreb, R. N., Lindsey, J. D. 2005. The importance of models in glaucoma research. *J Glaucoma*, 14: 302-4.
- Weljie, A. M., Newton, J., Mercier, P., Carlson, E., Slupsky, C. M. 2006. Targeted profiling: quantitative analysis of 1H NMR metabolomics data. *Anal Chem*, 78: 4430-42.
- Wessendorf, M. W. 1991. Fluoro-Gold: composition, and mechanism of uptake. *Brain Res*, 553: 135-48.

- Whitacre, M. M., Emig, M., Hassanein, K. 1991. The effect of Perkins, Tono-Pen, and Schiotz tonometry on intraocular pressure. *Am J Ophthalmol*, 111: 59-64.
- Wolf, S., Arend, O., Sponsel, W. E., Schulte, K., Cantor, L. B., Reim, M. 1993. Retinal hemodynamics using scanning laser ophthalmoscopy and hemorheology in chronic open-angle glaucoma. *Ophthalmology*, 100: 1561-6.
- Xu, G., Weinreb, R. N., Leung, C. K. 2013. Retinal Nerve Fiber Layer Progression in Glaucoma: A Comparison between Retinal Nerve Fiber Layer Thickness and Retardance. *Ophthalmology*.
- Xu, X., Karwoski, C. J. 1994. Current source density analysis of retinal field potentials. II. Pharmacological analysis of the b-wave and M-wave. *J Neurophysiol*, 72: 96-105.
- Yadav, U. C., Srivastava, S. K., Ramana, K. V. 2010. Understanding the role of aldose reductase in ocular inflammation. *Curr Mol Med*, 10: 540-9.
- Yan, D. B., Coloma, F. M., Metheetraitur, A., Trope, G. E., Heathcote, J. G., Ethier, C. R. 1994. Deformation of the lamina cribrosa by elevated intraocular pressure. *Br J Ophthalmol*, 78: 643-8.
- Yanase, J., Ogawa, H. 1997. Effects of halothane and sevoflurane on the electroretinogram of dogs. *Am J Vet Res*, 58: 904-9.
- Yoles, E., Schwartz, M. 1998. Elevation of intraocular glutamate levels in rats with partial lesion of the optic nerve. *Arch Ophthalmol*, 116: 906-10.
- Young, S. P., Wallace, G. R. 2009. Metabolomic analysis of human disease and its application to the eye. *J Ocul Biol Dis Infor*, 2: 235-242.
- Yu, S., Tanabe, T., Yoshimura, N. 2006. A rat model of glaucoma induced by episcleral vein ligation. *Exp Eye Res*, 83: 758-70.
- Yu, W., Cao, G., Qiu, J., Liu, X., Ma, J., Li, N., Yu, M., Yan, N., Chen, L., Pang, I. H. 2009. Evaluation of monkey intraocular pressure by rebound tonometer. *Mol Vis*, 15: 2196-201.
- Zanón-Moreno, V., Marco-Ventura, P., Lleó-Pérez, A., Pons-Vázquez, S., García-Medina, J. J., Vinuesa-Silva, I., Moreno-Nadal, M. A., Pinazo-Durán, M. D. 2008. Oxidative stress in primary open-angle glaucoma. *J Glaucoma*, 17: 263-8.
- Zhang, K., Yao, G., Gao, Y., Hofeldt, K. J., Lei, B. 2007. Frequency spectrum and amplitude analysis of dark- and light-adapted oscillatory potentials in albino mouse, rat and rabbit. *Doc Ophthalmol*, 115: 85-93.
- Zhou, L., Li, Y., Yue, B. Y. 1999. Oxidative stress affects cytoskeletal structure and cell-matrix interactions in cells from an ocular tissue: the trabecular meshwork. *J Cell Physiol*, 180: 182-9.