

UNIVERSIDAD DE MURCIA



1568044



**EFECTO A CORTO Y LARGO PLAZO DE
DIFERENTES PERIODOS DE ISQUEMIA
TRANSITORIA EN LA SUPERVIVENCIA DE LAS
CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA DE
RATA ADULTA: ESTUDIO CUANTITATIVO.**

INMACULADA SELLÉS NAVARRO

Laboratorio de Oftalmología Experimental

Dpto. de Oftalmología, Otorrinolaringología y Anatomía Patológica.

Universidad de Murcia.

1.995

24 NOV. 1995



**Tesis presentada en la Universidad de Murcia para acceder al
grado de Doctor en Medicina.**





UNIVERSIDAD DE MURCIA
DPTO. DE OFTALMOLOGIA, OTORRINOLARINGOLOGIA
Y ANATOMIA PATOLOGICA

LABORATORIO DE OFTALMOLOGIA EXPERIMENTAL
FACULTAD DE MEDICINA
30100 ESPINARDO - MURCIA - ESPAÑA
Teléf. 34 68 36 39 61 - Fax: 34 68 36 39 62
E. Mail OFMMV01 @ FC. UM. ES.

D. MANUEL VIDAL SANZ, COLABORADOR CIENTÍFICO DEL CONSEJO
SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS,

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral presentada por D^a. Inmaculada Sellés Navarro, titulada:
"EFECTO A CORTO Y LARGO PLAZO DE DIFERENTES PERIODOS DE
ISQUEMIA TRANSITORIA EN LA SUPERVIVENCIA DE LAS CÉLULAS
GANGLIONARES DE LA RETINA DE RATA ADULTA: ESTUDIO
CUANTITATIVO", ha sido realizada bajo mi dirección y tutela en el Laboratorio de
Oftalmología Experimental del Departamento de Oftalmología, Otorrinolaringología y
Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Murcia, y reúne
todos los requisitos para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo la presente en Murcia a
veintitrés de Noviembre de mil novecientos noventa y cinco.

Fdo: Dr. D. Manuel Vidal Sanz.

24 NOV. 1995





UNIVERSIDAD DE MURCIA
DPTO. DE OFTALMOLOGIA, OTORRINOLARINGOLOGIA
Y ANATOMIA PATOLOGICA

LABORATORIO DE OFTALMOLOGIA EXPERIMENTAL
FACULTAD DE MEDICINA
30100 ESPINARDO - MURCIA - ESPAÑA
Teléf. 34 68 36 39 61 - Fax: 34 68 36 39 62
E. Mail OFMMV01 @ FC. UM. ES.

D^a. MARÍA PAZ VILLEGAS PÉREZ, PROFESORA TITULAR DEL
DEPARTAMENTO DE OFTALMOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE
MURCIA,

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral presentada por D^a. Inmaculada Sellés Navarro, titulada:
"EFECTO A CORTO Y LARGO PLAZO DE DIFERENTES PERIODOS DE
ISQUEMIA TRANSITORIA EN LA SUPERVIVENCIA DE LAS CÉLULAS
GANGLIONARES DE LA RETINA DE RATA ADULTA: ESTUDIO
CUANTITATIVO", ha sido realizada bajo mi dirección y tutela en el Laboratorio de
Oftalmología Experimental del Departamento de Oftalmología, Otorrinolaringología y
Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Murcia, y reúne
todos los requisitos para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo la presente en Murcia a
veintitrés de Noviembre de mil novecientos noventa y cinco.

24 NOV. 1995



Fdo: Prof. María Paz Villegas Pérez.





UNIVERSIDAD DE MURCIA
DPTO. DE OFTALMOLOGIA, OTORRINOLARINGOLOGIA
Y ANATOMIA PATOLOGICA

LABORATORIO DE OFTALMOLOGIA EXPERIMENTAL
FACULTAD DE MEDICINA
30100 ESPINARDO - MURCIA - ESPAÑA
Teléf. 34 68 36 39 61 - Fax: 34 68 36 39 62
E. Mail OFMMV01 @ FC. UM. ES.

D. JAIME MIRALLES DE IMPERIAL, CATEDRÁTICO DE OFTALMOLOGÍA
DE LA UNIVERSIDAD DE MURCIA,

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral presentada por D^a. Inmaculada Sellés Navarro, titulada:
"EFECTO A CORTO Y LARGO PLAZO DE DIFERENTES PERIODOS DE
ISQUEMIA TRANSITORIA EN LA SUPERVIVENCIA DE LAS CÉLULAS
GANGLIONARES DE LA RETINA DE RATA ADULTA: ESTUDIO
CUANTITATIVO", ha sido realizada bajo mi dirección y tutela en el Laboratorio de
Oftalmología Experimental del Departamento de Oftalmología, Otorrinolaringología y
Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Murcia, y reúne
todos los requisitos para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo la presente en Murcia a
veintitrés de Noviembre de mil novecientos noventa y cinco.

Fdo: Prof. Jaime Miralles de Imperial





DEPARTAMENTO
DE
MEDICINA INTERNA
—
UNIVERSIDAD DE MURCIA

D. FERNANDO SÁNCHEZ GASCÓN, Profesor Titular del Departamento de Medicina Interna de la Universidad de Murcia,

AUTORIZA, en calidad de Director del Departamento de Medicina Interna, y en calidad de Tutor de Dña. Inmaculada Sellés Navarro, la presentación y defensa de la Tesis Doctoral titulada "**Efecto a corto y largo plazo de diferentes periodos de isquemia transitoria en la supervivencia de las células ganglionares de la retina de la rata adulta: Estudio cuantitativo**", realizada por Dña. Inmaculada Sellés Navarro.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo la presente en Murcia, a veintidos de Noviembre de mil novecientos noventa y cinco.



Fdo.: Prof. D. Fernando Sánchez Gascón.

24 NOV, 1995



Agradecimientos:

Quiero expresar mi agradecimiento a todas las personas que de una u otra forma han contribuido a que este trabajo, mi tesis, pudiera ser una realidad.

Muy especialmente quiero dar las gracias al Dr. Manuel Vidal , director de mi tesis, por todo su esfuerzo y dedicación día a día para que este trabajo llegara a buen término. Es para mi una satisfacción haber podido trabajar en investigación bajo su tutela; su rigor científico, su inagotable capacidad de trabajo y su calidad humana te inducen dedicarle a la investigación cada día un poco más de tí.

Quiero expresar también todo mi agradecimiento, respeto y cariño a la persona con la que en los últimos tres años he compartido muchas horas de trabajo, pero sobre todo de amistad y afecto, M^a Paz Villegas. Por toda tu ayuda y aliento en la realización de esta tesis, muchas gracias M^a Paz.

De forma especial quiero expresar mi agradecimiento al Prof. Jaime Miralles de Imperial, por su ayuda y apoyo en todo momento para obviar cualquier problema que pudiera interferir en mi formación tanto clínica como académica.

Al Prof. Ruíz Gómez, por su colaboración desinteresada en la valoración estadística de de los datos, por su gran amabilidad.

A Mercedes Salvador porque sólo ella es así, especial en su amistad, en su ayuda, en ingenio... , muchas gracias Mercedes.

A Elena Rogríguez y Ana M^a Gómez por su amistad y su ayuda. A Paloma, Lidia, Reme por las buenas horas compartidas. A Marcelino, por su esfuerzo desinteresado, por toda su ayuda. Muchas Gracias.

A mi familia y amigos por el apoyo continuo, por su cariño y la confianza que depositan en mi.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	2
1.1. ANATOMÍA DEL OJO DE LA RATA ADULTA	2
1.1.1. Breve repaso general a la estructura del globo ocular	2
1.1.2. Vascularización	3
1.1.3. La retina de la rata adulta	5
1.1.3.1. Estructura de la retina	5
1.1.3.2. Capa de células ganglionares	6
1.1.3.3. Proyecciones axonales	8
1.2. MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS IMPLICADOS EN LA LESIÓN CELULAR POR ISQUEMIA-REPERFUSIÓN	10
1.2.1. Teoría de neurotoxicidad del glutamato	11
1.2.1.1. El Glutamato como neurotransmisor	11
1.2.1.2. Isquemia y glutamato	12
1.2.1.3. Toxicidad del glutamato	14
1.2.1.4. Métodos para antagonizar la neurotoxicidad del glutamato	17
1.2.2. Producción de radicales libres	19
1.2.2.1. Concepto de radical libre	20
1.2.2.2. Formación fisiológica de radicales libres y mecanismos de defensa	20
1.2.2.3. Mecanismos de producción de los radicales libres durante la reperfusión postisquemia	21
1.2.2.4. Toxicidad por radicales libres	22
1.2.2.5. Métodos para antagonizar la toxicidad de los radicales libres	23
1.2.3. Otros factores que pueden neutralizar los efectos de la isquemia	25
1.2.4. Otros mecanismos mediadores de la lesión isquémica	27
1.2.5. Estudio comparativo de la tolerancia a la isquemia entre cerebro y retina	27
1.2.6. Muerte celular producida por isquemia-reperfusión de la retina	30
1.2.6.1. Evidencia de apoptosis tras la lesión de las CGR por axotomía o isquemia	31
1.3. TÉCNICAS EXPERIMENTALES PARA LA OBTENCIÓN DE ISQUEMIA RETINIANA	34
1.3.2. Técnicas reversibles de isquemia retiniana	35
1.3.2.1. Por incremento de la Presión Intraocular (PIO)	35
1.3.2.2. Abordaje de vasos oculares a nivel retobulbar	39
1.3.2.2.1. Disección y clampaje de la arteria central de la retina	39
1.3.2.2.2. Compresión de toda la vascularización ocular	39
1.3.2.3. Compresión directa sobre las arterias retinianas	40
1.3.3. Técnicas irreversibles de isquemia retiniana	41
1.3.3.1. Fotocoagulación de los vasos retinianos	41
1.3.3.2. Obstrucción de la circulación retiniana con microesferas ...	41
1.3.3.3. Clampaje vascular extraocular	42
1.4. ISQUEMIAS RETINIANAS: ESTUDIOS PREVIOS	43
1.4.1.- Isquemia retiniana en monos	44
1.4.2. Isquemia retinianas en otros animales de experimentación	46
1.4.3. Muerte celular postisquemia	50
2. OBJETIVOS	52

3. MATERIAL Y MÉTODOS	57
3.1. INTRODUCCIÓN	57
3.2. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN Y ANESTESIA	59
3.3. MARCAJE RETRÓGRADO DE LAS CÉLULAS GANGLIONARES	60
3.3.1. Técnica	60
3.3.2. Estudio del tiempo necesario para obtener el marcaje de las CGR ...	61
3.3.3. Estudio de la permanencia del FG en el soma celular a lo largo del tiempo	63
3.4. MODELO DE ISQUEMIA RETINIANA	64
3.4.1. Método de obtención de la isquemia retiniana	64
3.4.2. Obstrucción de la circulación retiniana por incremento de la presión intraocular	67
3.4.3. Estudio del grado de interrupción del flujo sanguíneo ocular	68
3.5. GRUPOS EXPERIMENTALES DE ISQUEMIA RETINIANA	69
3.6. PROCESO DE LAS RETINAS	70
3.6.1. Manejo del globo ocular y preparación de las retinas	70
3.6.2. Estimación de la densidad de CGR por mm ²	71
3.7. ISQUEMIA INDUCIDA POR LA LIGADURA SELECTIVA DE LA ARTERIA OFTÁLMICA	73
3.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	75
4.- RESULTADOS	78
4.1. INCREMENTOS DE LA PRESIÓN INTRAOCULAR QUE PRODUCEN UNA INTERRUPTIÓN DEL FLUJO SANGUÍNEO DE LA RETINA	79
4.1.1. Incremento de la presión intraocular como factor desencadenante de la detención del flujo sanguíneo retiniano	79
4.1.2. Estudio del grado de interrupción del flujo sanguíneo retiniano	82
4.2. UTILIDAD DEL FLUOROGOLD COMO MARCADOR PERSISTENTE DE LAS CGR	83
4.2.1. Tiempo requerido para obtener el marcaje de las CGR con FG.	83
4.2.2. Densidades de CGR en las retinas de los ojos derechos o controles: Persistencia del FG	84
4.3. SUPERVIVENCIA DE CGR TRAS DIFERENTES PERIODOS DE ISQUEMIA TRANSITORIA DE LA RETINA	91
4.4. SUPERVIVENCIA DE LAS CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA TRAS DIVERSOS INTERVALOS DE REPERFUSIÓN	127
4.5. SUPERVIVENCIA DE LAS CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA TRAS LIGADURA SELECTIVA DE LA ARTERIA OFTÁLMICA: RESULTADOS PRELIMINARES	135
5.- DISCUSIÓN	140

5.1. LA RETINA COMO MODELO PARA EL ESTUDIO DE LA MUERTE NEURONAL INDUCIDA POR LA ISQUEMIA TRANSITORIA	141
5.2. MODELO DE INCREMENTO DE LA PRESIÓN INTRAOCULAR PARA INDUCIR ISQUEMIA TRANSITORIA DE LA RETINA	144
5.3. USO DEL FLUOROGOLD PARA IDENTIFICAR LAS CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA	146
5.4. MARCAJE CON FLUOROGOLD EN RETINAS CONTROL Y EXPERIMENTALES	147
5.5. PERSISTENCIA DEL FLUOROGOLD	149
5.6. ISQUEMIA TRANSITORIA INDUCIDA POR AUMENTO DE LA PIO: MUERTE DE LAS CGR	151
5.6.1. Supervivencia de las CGR tras diferentes periodos de isquemia transitoria	151
5.6.1.1. Periodo de supervivencia de 30 días	151
5.6.1.2. Períodos de supervivencia de 14, 7, y 5 días	153
5.6.2. Efecto del intervalo de reperusión en la muerte de las CGR	154
5.6.2.1. Muerte inicial brusca de CGR inducida por isquemia transitoria	155
5.6.2.2. Muerte retrasada y lenta de CGR inducida por isquemia transitoria	156
5.7. ISQUEMIA TRANSITORIA INDUCIDA POR LIGADURA SELECTIVA DE LA ARTERIA OFTÁLMICA: MUERTE DE LAS CGR	159
5.8. POSIBLE APLICABILIDAD DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN NUESTROS ESTUDIOS: IMPLICACIONES CLÍNICAS	160
6. CONCLUSIONES	164
7. BIBLIOGRAFÍA	168

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ANATOMÍA DEL OJO DE LA RATA ADULTA

En este primer capítulo de la introducción realizamos un breve recordatorio de los aspectos del sistema visual de la rata que han constituido el sustrato anatómico de nuestro estudio: El globo ocular, la retina y la proyección retino-mesencefálica. Este capítulo se ha dividido en dos apartados, en el primero se realiza un resumen de la anatomía general y vascularización del globo ocular y en el segundo revisamos en mayor detalle la retina y en especial la capa de células ganglionares, así como la proyección retinocolicular.

1.1.1. Breve repaso general a la estructura del globo ocular

El globo ocular de la rata adulta presenta una morfología similar a la del resto de mamíferos. Es un órgano casi esférico que posee un diámetro anteroposterior de 6,42 mm. y un diámetro ecuatorial de 6,32 mm. La cubierta externa del globo ocular está formada en su parte anterior por la córnea que en este animal destaca por su gran tamaño. La córnea se continua hacia atrás con

la esclera que está recubierta en su parte anterior por la conjuntiva. El iris es muy fino y se extiende desde el cuerpo ciliar hasta cubrir la cara anterior del cristalino. El diámetro pupilar es variable según la intensidad de luz ya que la rata posee reflejo fotomotor directo y consensual. El cristalino es casi esférico y tiene un gran tamaño por lo que ocupa gran parte del globo ocular. En la rata, el músculo ciliar no está bien desarrollado, pero sí el ligamento suspensorio del cristalino (Janes y Bounds, 1955). La retina tapiza la cara interna del globo ocular y está en contacto con la coroides por su parte externa y con el vítreo por la interna. En la rata albina Sprague-Dawley que hemos utilizado como animal de experimentación, se puede observar por transparencia la vascularización iridiana y los vasos de la coroides a través de la retina porque el epitelio pigmentario no posee gránulos de melanina.

1.1.2. Vascularización

La arteria oftálmica provee la irrigación sanguínea a todas las estructuras oculares de la rata. En la órbita se dirige hacia la zona posterior del globo ocular corriendo paralela al nervio óptico, entre la vainas que lo recubren y entra en el ojo por el cuadrante inferonasal del nervio óptico. La primera rama que da al atravesar la esclera es normalmente la arteria central de la retina, luego se ramifica en dos arterias ciliares cortas posteriores y cuatro arterias ciliares largas posteriores. Las arterias ciliares anteriores no existen en la rata (Janes y Bounds, 1955).

La esclera es avascular, recibiendo su nutrición por difusión desde la coroides o desde el tejido epiescleral. La coroides va a estar formada por las arterias ciliares cortas posteriores, que son de 2 a 4, y salen o bien directamente como ramas de la arteria oftálmica, como hemos visto antes, o bien como ramas de las ciliares largas posteriores. La irrigación del iris y del cuerpo ciliar procede de las arterias ciliares largas posteriores que viajan por el espacio supracoroideo

para penetrar en la coroides a nivel de ecuador y continúan su trayecto hacia delante, dividiéndose para formar el círculo mayor del iris. En la rata no existe círculo arterial menor del iris (Janes y Bounds, 1955).

El drenaje venoso de la coroides y de la mayor parte de iris y del cuerpo ciliar se realiza a través de 4 venas vorticosas, localizadas una en cada cuadrante retiniano (superior, inferior, nasal y temporal). Salen del globo ocular atravesando la esclera por su zona ecuatorial, y sus ampollas de recepción se ven por transparencia a través de la retina de la rata albina (Janes y Bounds, 1955).

La vascularización de la retina se va a realizar por la arteria central de la retina, la cual emerge en la retina a través de la papila y se divide normalmente en 6 ramas terminales, aunque a veces pueden ser 5 ó 7, las cuales se dirigen de forma radial hacia el ecuador. Las venas de la retina siguen un camino radial similar al de las arterias (Janes y Bounds, 1955). Cada vena se suele situar entre dos arterias y aunque tanto las arterias como las venas tienen un recorrido radial se distinguen porque las arterias son más estrechas y tienen un color rojo más vivo que las venas. Arterias y venas retinianas se dividen dicotómicamente en ángulo agudo para formar una fina red vascular que se extiende superficialmente en la capa de las fibras nerviosas y de dirección perpendicular u oblicua que penetran hasta la capa nuclear interna. En estas dos capas se forma una red capilar anastomótica que se continúa con el sistema venoso. Las venas retinianas se unen a nivel de la papila para formar la vena central de la retina, que en el disco óptico se localiza postero-temporal a la arteria central de la retina, sale del globo ocular, viajando en la órbita medial al nervio óptico pero temporal a la arteria oftálmica (Janes y Bounds, 1955).

1.1.3. La retina de la rata adulta

La retina es una extensión sensorial del sistema nervioso central (SNC) que contiene diversas clases de neuronas organizadas en capas y especializadas para procesar el estímulo visual. El proceso del estímulo visual se inicia activando a los elementos fotosensibles de la retina (fotorreceptores) y se transmite hasta las células ganglionares de la retina (CGR), cuyas prolongaciones axonales constituyen el nervio óptico, que transmitirá la información hasta los núcleos retino-recipientes del cerebro. En la rata, en contraste con el gato y el mono, las principales proyecciones de las CGR en el cerebro se realizan a nivel del colículo superior (CS) y del núcleo geniculado dorsolateral (NGDL) (Linden y Perry, 1983; Martin, 1986).

1.1.3.1. Estructura de la retina

La retina de la rata como en otros vertebrados (Ramón y Cajal, 1892; Gallego, 1971) está constituida por diferentes capas, que desde su parte más interna (en relación con el vítreo) hacia la más externa son: i) Membrana limitante interna, la cual separa el cuerpo vítreo de la capa de fibras nerviosas; ii) Capa de fibras nerviosas; iii) Capa de células ganglionares, constituida principalmente por estas células y por células amacrinas desplazadas; iv) Capa plexiforme interna que contiene procesos de las células amacrinas, células ganglionares y axones de las células bipolares; v) Capa nuclear interna, formada por células amacrinas en su parte más interna, el soma de las células horizontales en la zona más externa, y el cuerpo de las células bipolares y de las células de Müller en su zona intermedia; vi) Capa plexiforme externa, que contiene la base de las células de los receptores, y los procesos de las células bipolares y horizontales; vii) Capa nuclear externa, formada por el soma que contiene el núcleo de los fotorreceptores; viii) Membrana limitante externa, situada entre el

cuerpo de los fotorreceptores y su segmento externo; ix) Capa de los fotorreceptores, que contiene el segmento externo de estas células; y x) Epitelio pigmentario, que en las ratas albinas no contiene melanina, de ahí que en estos animales, a través de la retina se puedan ver por transparencia los vasos coroideos.

1.1.3.2. Capa de células ganglionares

En la capa de CGR de la rata adulta hay principalmente dos tipos de células, las CGR propiamente dichas y las amacrinas desplazadas, que constituyen aproximadamente el 50% de las neuronas de esta capa (Perry, 1981). La densidad celular de la capa de CGR no es uniforme en toda la retina, ya que presenta un área de densidad máxima situado en la región superotemporal, a 1-1,5 mm del nervio óptico. Esta zona de máxima densidad celular se conoce con el nombre de área central y se ha estimado que la densidad celular en este área es de aproximadamente 6.200-6.500 células/mm², cuando se identifican las células con tinciones para la substancia de Nissl (Fukuda, 1977). La densidad celular de la capa de las CGR decrece desde el área central hacia la periferia retiniana donde la densidad mínima es de aproximadamente 1.000 células/mm² (Fukuda, 1977).

Sin embargo, cuando se estudia la densidad celular de la capa de las células ganglionares con tinciones para la substancia de Nissl, no se diferencian los diversos tipos de neuronas que constituyen esta capa, por lo que no se puede valorar con exactitud la densidad de las células ganglionares solamente. Para realizar esto último, se han utilizado marcadores neuronales retrógrados aplicados en los centros visuales del cerebro, y de esta forma se han podido identificar y diferenciar a la CGR de otras células. Con estas técnicas, se ha observado que la densidad de CGR en las regiones más centrales de la retina es de 2.500 células por mm² (Perry, 1981; Villegas-Pérez y cols., 1988; Vidal-Sanz

y cols., 1988), y en la perifería retiniana es de 1.600 células por mm² (Perry, 1981). El número total de CGR de la retina de la rata adulta estimadas utilizando peroxidasa como trazador neuronal retrógrado se ha estimado que varía entre 110.000 y 115.000 (Potts y cols., 1982; Perry, 1981; Perry y Linden, 1982; Perry y cols., 1983; Dreher y cols., 1984)

Cuando se estudia la morfología de la CGR se observan células con soma de diferente tamaño. En base a este criterio las CGR se han clasificado en pequeñas, medianas y grandes (Fukuda, 1977). Las células grandes tendrían un tamaño mayor a 14,5 micras, representan aproximadamente el 5% del total de CGR y están distribuidas por toda la retina. Las células de tamaño medio tienen un diámetro mayor de 11,5 micras pero inferior a 14,5 micras, representan un 28% de las CGR y son más abundantes cerca del disco óptico; por último, las células de tamaño pequeño son aquellas con un diámetro inferior a 11,5 micras y superior a 6 micras, representan el 67% de la población de las CGR y están distribuidas por toda la retina.

Existe una correlación entre el tamaño del soma y del axón (Perry, 1977), así como en su respuesta electrofisiológica a la luz (Fukuda, 1977). Las CGR pequeñas, localizadas próximas al disco óptico se han denominado células X, transmiten información procedente de los conos, tienen axones de pequeño diámetro, y campos receptivos pequeños. Las células grandes, llamadas células Y, transmiten información procedente de los bastones, tienen axones de diámetro grande y campos receptivos grandes. Otras células pequeñas se han denominado W, y proyectan al colículo superior (Lennie, 1980).

Existe un pequeño porcentaje de CGR que se localizan en la capa nuclear interna, entre las células amacrinas, que son las llamadas células ganglionares

desplazadas o células de Dogiel, y que constituyen el 0,35% del total de la población de CGR en la rata (Linden, 1987).

También se han observado CGR cuyo axón no proyecta fuera de la retina, que son las llamadas células ganglionares de asociación. Fueron descritas por Gallego y Cruz (1965), en humanos y en perros, y que más tarde se han observado ocasionalmente en ratas y ratones (Dräger y cols., 1984).

1.1.3.3. Proyecciones axonales

Los axones de las CGR confluyen centrípetamente para formar el nervio óptico. Aproximadamente el 95% de las fibras nerviosas del nervio óptico en la rata se van a decusar en el quiasma hacia el tracto óptico contralateral (Cusick y Lund, 1982), proyectando así la mayor parte de sus fibras al hemisferio cerebral contralateral.

En todos los vertebrados, las CGR proyectan hacia seis regiones del cerebro: i) Hipotálamo; ii) Núcleos del sistema óptico accesorio; iii) Pretectum; iv) Colículo superior; v) Núcleo geniculado ventrolateral y vi) Núcleo geniculado dorsolateral. En la rata, los principales núcleos de proyección de los axones que forman el tracto óptico son el colículo superior y el núcleo geniculado dorsolateral (NGDL).

Cada tracto óptico está formado pues, en la rata, por aproximadamente un 95% de fibras cruzadas o contralaterales (Cusick y Lund, 1982). Las fibras ipsilaterales que forman el tracto óptico proceden de CGR localizadas en la zona temporal de la retina (Dreher y cols., 1984) y aproximadamente el 1% de las CGR que proyectan ipsilateralmente envían proyecciones colaterales al tracto óptico contralateral (Jeffery y cols., 1981). La gran mayoría de las fibras que proyectan contralateralmente envían su axón al colículo superior (Dreher y cols., 1984), y sólo un 20-35% de éstas envían su axón al NGDL (Dreher y

Martin, 1986). La mayoría de las neuronas de este núcleo proyectan en la corteza cerebral homolateral, haciendo sinápsis en las áreas 17, 18a y 18b situadas en forma de banda alrededor del área 17.

1.2. MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS IMPLICADOS EN LA LESIÓN CELULAR POR ISQUEMIA-REPERFUSIÓN.

Entendemos el concepto de isquemia tisular como la detención o disminución de flujo sanguíneo en una determinada zona del organismo, que comporta un estado de sufrimiento celular por falta de oxígeno y materias nutritivas. Para valorar los efectos de la isquemia, no sólo tenemos que tener presente el grado de reducción del flujo sanguíneo sino también el tiempo que se mantiene esta situación y el tipo de tejido afectado. En nuestro caso, nos centraremos en el sistema nervioso central (SNC) y en particular en la retina.

En la lesión tisular producida por la falta de perfusión sanguínea, se producen alteraciones metabólicas derivadas principalmente de la privación de dos nutrientes esenciales, el oxígeno y la glucosa. Como consecuencia se produce la interrupción en la formación de ATP y la pérdida del funcionamiento de la bomba sodio/potasio, con la consiguiente disfunción iónica celular, que desemboca en la lesión y muerte de la célula (Anderson, 1979). Por otra parte existen datos que sugieren que en el SNC sometido a condiciones de isquemia transitoria o reversible se pueden originar unas alteraciones de la bioquímica celular que inducen la degeneración y muerte, en células que hasta ese momento presentaban una lesión reversible. En la explicación de este fenómeno se ha implicado fundamentalmente dos factores, a la vez relacionados entre si: **1) Neurotoxicidad del L-glutamato:** Se produciría una sobrestimulación de los receptores N-metil-D-Aspartato (NMDA) y no-NMDA, por un exceso de liberación endógena de L-glutamato, que conlleva a un incremento del calcio libre intracelular (Choi, 1988); **2) Producción de radicales libres derivados del**

oxígeno, lo que se observa sobre todo en la reperfusión post-isquemia (Olney, 1978).

1.2.1. Teoría de neurotoxicidad del glutamato

1.2.1.1. El Glutamato como neurotransmisor

El glutamato y otros derivados relacionados, son los neurotransmisores excitadores principales en el SNC de los vertebrados (Camello, 1994). Además, en la retina existe evidencia de que este aminoácido pueda ser un neurotransmisor liberado por los fotorreceptores y por las células ganglionares de la retina (Alder y Farber, 1986) .

El glutamato y sus derivados actúan a través de varias clases de receptores, de los cuales el NMDA (N-Metil-D-Aspartato) es el mejor conocido. En el SNC también se han reconocido otros receptores para aminoácidos menos definidos que el NMDA, como el kainato y quisqualato, también conocidos como receptores no-NMDA, y que deben su nombre a la sustancia que actúa como agonista principal, aunque hay evidencia de que el receptor quisqualato sea activado más específicamente por α -amino-3-5-methyl-4-isoxazole propionato (AMPA), que por el propio quisqualato.

De todos los agonistas del receptor NMDA, el glutamato es el que más alta afinidad presenta para este receptor (Cotman y Monaghan, 1988), aunque otros neurotransmisores como el L-aspartato (Collins y cols., 1981), el L-homocisteato (Do y cols, 1986) y el quinolato (Stone y Connick, 1985) pueden unirse también a este receptor. Se postula que el Zn^{+2} y el glutamato en combinación puedan actuar como agonistas (Peters y cols., 1987) de los receptores no-NMDA.

Los canales que abren todos los tipos de receptores del glutamato (NMDA y no-NMDA) son permeables al sodio y al potasio; los canales abiertos por el receptor NMDA poseen además alta permeabilidad al calcio.

1.2.1.2. Isquemia y glutamato

La llamada teoría de la neurotoxicidad del glutamato desencadenada por la excesiva liberación de este aminoácido en situaciones de isquemia intenta dar explicación a los eventos celulares que conllevan a la degeneración y muerte neuronal tras estados de hipoxia o anoxia (Choi, 1988; Olney, 1986; Rothman y Olney, 1986).

La lesión neuronal se puede separar de manera global en dos componentes. Un componente agudo, dependiente del Na⁺, caracterizado por hinchazón celular inmediata y otro retrasado o dilatado en el tiempo inducido más directamente por el glutamato, que conlleva a un incremento del Ca²⁺ intracelular promotor de una degeneración celular más lenta en el tiempo (Choi, 1988; Rothman y Olney, 1986). El primer componente podría ser responsable de la degeneración edematosa aguda, mientras que el segundo componente se podría relacionar con la degeneración celular o muerte neuronal retrasada (Choi, 1988) y quizás con el tipo de muerte neuronal apoptótico.

En situaciones de isquemia se produce un incremento de los niveles de glutamato extracelular, evidenciado por técnicas de microdiálisis en estudios realizados en situación de anoxia, tanto cerebral (Benveniste, 1984; Pellegrini-Giamprieto y cols., 1990), como retiniana (Louzada-Junior y cols., 1992). Pero además, en determinaciones de los niveles de aminoácidos excitadores en el cerebro realizadas por la misma técnica, en situación de isquemia, se ha detectado incrementos significativos de glutamato y aspartato con respecto a sus niveles basales en los primeros 10 minutos de isquemia, (Benveniste, 1984). Se

ha postulado que estos niveles elevados de glutamato que acompañan a las situaciones de anoxia inducen neurotoxicidad, al ser capaces de desencadenar una serie de alteraciones celulares que conducen a la muerte neuronal (Choi, 1988).

Los efectos tóxicos del glutamato y aspartato sobre la retina ya fueron descritos por Lucas y Newhouse en 1957, al observar que la inyección subcutánea de glutamato en ratas jóvenes producía una destrucción severa de las capas internas de la retina, principalmente la capa de las CGR. Posteriormente Olney (1969) utilizando técnicas ultraestructurales demostró una toxicidad retiniana similar a la del glutamato en ratones y acuñó el término de excitotoxicidad para describir estas lesiones. Sisk y Kuwabara (1985) inyectaron glutamato intravítreo en ratas albinas y observaron la degeneración de la capa nuclear interna y la capa de las células ganglionares.

En el análisis de retinas de embrión de pollo sometidas a anoxia experimental (David y cols., 1988) se han observado lesiones histológicas de características similares a las producidas en retinas expuestas a glutamato. Esta similitud histológica observada entre el daño del tejido retiniano por la isquemia o por exposición al glutamato, viene apoyada por estudios electrofisiológicos obtenidos en retinas durante isquemias inducidas (Hankins e Ikeda, 1992), las cuales guardan gran similitud con las causadas por la exposición de la retina al glutamato u otros aminoácidos excitadores.

Se ha establecido que la forma predominante de excitotoxicidad en las CGR está mediada por la sobreestimulación del subtipo de receptor , el metil-D-aspartato (NMDA) por el glutamato, que a su vez va a desencadenar niveles excesivos de Ca^{2+} libre intracelular (Choi., 1988)



Los niveles de glutamato en las terminaciones nerviosas parece depender de la disponibilidad extracelular de ciertos precursores (especialmente glutamina) que normalmente son suplidos por la glia (Cordoba, 1994). El mecanismo responsable del incremento de las concentraciones de glutamato en el espacio extracelular tras la isquemia es todavía desconocido, sin embargo están mejor establecidas las consecuencias derivadas del exceso de glutamato por la sobreestimulación de los receptores NMDA y no-NMDA (kainato y quisqualato), como son el hinchazón de las dendritas y el cuerpo celular de las neuronas y la progresiva degeneración y muerte neuronal (Olney, 1969; Choi 1988).

1.2.1.3. Toxicidad del glutamato

Estudios efectuados en el SNC durante las últimas tres décadas han documentado que la lesión neuronal traumática y la isquémica pueden estar mediadas por niveles excesivos de aminoácidos excitadores, en especial el glutamato (Choi, 1988; Meldrum y Garthwaite, 1990). Estas investigaciones previas han explorado fundamentalmente el papel del glutamato en la trombosis cerebral, la epilepsia, enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Huntington, la esclerosis lateral amiotrófica y la demencia asociada al síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (Choi, 1988; Meldrum y Garthwaite, 1990; Choi, 1992).

La sobreestimulación de los receptores neuronales NMDA y no-NMDA (kainato y AMPA/quisqualato), por los niveles excesivos de glutamato en el espacio extracelular induce una serie de eventos celulares que se podrían esquematizar en las siguientes fases (revisado por: Choi, 1990).

En una primera fase, llamada de inducción, como consecuencia de la estimulación por el glutamato de los receptores NMDA y no-NMDA se produce un aumento de la permeabilidad de la membrana con acúmulo intracelular de

deplección de potasio (Choi 1988). Aunque los receptores NMDA juegan un papel en la mediación de la excitotoxicidad mediada por la hipoxia, la activación de los receptores no-NMDA parecen contribuir a aumentar la lesión (Frandsen y cols., 1988).

En la segunda fase o fase de ampliación de la respuesta se produce una cascada postsináptica que aumenta la intensidad de las alteraciones iniciales y promueve la amplificación de la excitotoxicidad a otras neuronas. El responsable de la mayor parte de las alteraciones que se producen en la célula estarán mediadas por los altos niveles del calcio intracelular $[Ca^{2+}]_i$ (Mattson, 1992; Siesjo y cols., 1989).

El $[Ca^{2+}]_i$ se mantiene en condiciones normales a una concentración aproximada de 100nM contra un gradiente extracelular a través de la membrana 10.000 veces superior. Esto se consigue por la presencia en la membrana citoplasmática de bombas de Ca^{2+} y del intercambiador Na^+/Ca^{2+} , por la captación de calcio en depósitos internos y por el ligado de calcio a proteínas específicas. Elevaciones sostenidas de Ca^{2+} intracelular pueden inducir daño neuronal y muerte (Choi, 1988; Mattson, 1992). Durante la isquemia el calcio entra en la célula inicialmente a través de los canales NMDA mediado por la estimulación del glutamato, pero también puede hacerlo a través de otros canales como los canales voltaje dependientes (Choi, 1988) o por intercambio sodio-calcio (Nachsen y cols., 1986). Además, el aumento en los niveles de inositol trifosfato que se producen en la primera fase induciría la liberación de calcio desde los almacenes intracelulares (Berridge e Irvine, 1989). Como consecuencia de la elevación de calcio intracelular libre se van a activar gran cantidad de enzimas, proteasas, endonucleasas y fosfolipasas, responsables de los eventos que conllevan a la degeneración neuronal en la tercera o última fase. La despolarización de la célula, la acumulación de calcio y el daño de membrana

por las enzimas liberadas potenciarían además el flujo secundario de las reservas endógenas de glutamato (Díaz-Guerra y cols., 1988) continuando así con la sobrestimulación de los receptores de glutamato (feed back positivo) (Kimura y cols., 1985). Esto explicaría que los antagonistas de los receptores NMDA administrados después del final de la exposición de niveles tóxicos del glutamato, puedan reducir la muerte neuronal resultante (Foster y cols., 1988).

La tercera fase sería la fase de expresión que desemboca en la desintegración celular (Choi, 1988, Siesjö y Bengtsson, 1989). El evento desencadenante de esta fase son los altos niveles de calcio intracelular libre, con activación de enzimas degradantes y la generación de radicales libres. Las enzimas degradantes activadas por el calcio van a producir una autoproteólisis de la célula. Fosfolipasas como la fosfolipasa A₂ degrada los fosfolípidos de la membrana, formando ácidos grasos libres, contribuyendo al fallo celular. Estos fosfolípidos son los precursores del ácido araquidónico, lo que contribuye a incrementar los niveles de esta sustancia en condiciones de isquemia. El ácido araquidónico en presencia de oxígeno, como ocurre cuando se inicia la reperfusión del tejido isquemiado es metabolizado en el medio extracelular por las vías de la ciclo y de la lipooxigenasa, con liberación de radicales libres como metabolitos intermediarios (Siesjö, 1989). Estas reacciones que se dan en presencia de oxígeno las relacionamos con la cadena de acontecimientos que ocurren durante la reperfusión sanguínea postisquemia (formación de radicales libres) y que veremos más adelante.

Otras enzimas también activadas por el calcio son las endonucleasas que van a inducir la fragmentación del DNA, proceso que ocurre en la muerte celular programada y que puede ser el límite último para una posible recuperación (Nicotera y cols., 1989).

1.2.1.4. Métodos para antagonizar la neurotoxicidad del glutamato

Se ha propuesto que para evitar la neurotoxicidad del glutamato la estrategia terapéutica se debe centrar en antagonizar la fase de inducción, mediante la administración de antagonistas de los receptores NMDA y no-NMDA, impidiendo así su estimulación. También se podría actuar antagonizando la fase de ampliación y de expresión evitando los cambios intracelulares que desencadenan la lisis celular.

1.2.1.4.1. Antagonistas de la fase de inducción

Sería lógico pensar que siendo el glutamato en gran medida el responsable de la neurotoxicidad en situaciones de isquemia, se podrían evitar sus efectos bien impidiendo su liberación de las terminales presinápticas, o bien impidiendo que actúe a nivel postsináptico, es decir, bloqueando los receptores NMDA y no-NMDA mediante sustancias antagonistas. Se puede impedir o disminuir la liberación excesiva de glutamato de las terminales presinápticas, mediante la administración de inhibidores de los radicales libres y la hipotermia. Parece existir una mutua cooperación entre los radicales libres desencadenados por la situación de hipoxia y la liberación de aminoácidos excitadores (Pellegrini-Giamprieto y cols., 1990). Es decir, se produce un círculo vicioso por el que la formación de radicales libres estimularían la liberación presináptica de aminoácidos excitadores y a la vez estos generan el sustrato para la formación de más radicales citotóxicos. Esto hace que la utilización de bloqueantes de radicales libres se puede considerar un antagonista de la fase de inducción al favorecer una menor liberación sináptica de glutamato.

La hipotermia también tiene un marcado efecto neuroprotector durante la isquemia, aunque los mecanismos por el que se produce este efecto no están claros (Busto y cols., 1987). Se postula que la hipotermia produce una disminución en la biosíntesis y liberación de aminoácidos excitadores (Choi,

1988). Existe evidencia de que la disminución de la temperatura cerebral tan solo unos pocos grados durante la isquemia (34°C) confiere un marcado efecto neuroprotector (Busto y cols., 1987). Igualmente se ha observado que la tolerancia de la retina a la isquemia también se incrementa en condiciones de hipotermia (Faberowski y cols., 1989).

Entre las sustancias que podrían ser administradas para impedir la unión del glutamato a su receptor, y por lo tanto evitando el inicio de la cascada neurotóxica, están los antagonistas de los receptores NMDA y no-NMDA. Estudios recientes llevados a cabo con antagonistas no competitivos de los receptores NMDA y no-NMDA muestran un efecto protector frente el daño isquémico neuronal, siendo efectivos incluso cuando se administran tras varias horas de finalizar el insulto isquémico (Foster y cols., 1988). Antagonistas selectivos de los receptores NMDA son la dizocilpina (MK-801) (McDonald y cols., 1987; Gill y cols., 1987; Iversen, 1991; Mosinger y cols., 1991) y el ácido fosfoheptanoico (APH) (Simon y cols., 1984) y el derivado opiáceo dextrometorfano (Yoon y Marmor., 1989), utilizado como antitusivo. Presentan el mismo mecanismo de acción anestésicos que la ketamina y la fenciclidina (Tsukahara y cols., 1992). La Ketamina es un anestésico frecuentemente usado en animales de experimentación, por lo que su utilización debe de valorarse si la investigación está orientada a estudiar los efectos de la isquemia (Olney y cols., 1986). La acción del glutamato también ha podido ser bloqueada por sustancias como la dopamina (Kashii y cols., 1994).

Entre los antagonistas competitivos de los receptores NMDA, con demostrados efectos beneficiosos ante la lesión isquémica se encuentra el CGS-19755 (Grotta y cols., 1990).

Se conocen menos antagonistas selectivos de los receptores no-NMDA, aunque recientemente ha sido descrito un derivado de la quinoxalina (CNQX). Se ha utilizado en el tratamiento de retinas sometidas a isquemia (Mosinger y cols., 1991) aunque no encuentran efectos significativos cuando lo administran como droga única, pero sí cuando es administrada junto con un antagonista selectivo de los receptores NMDA (MK-801), cuando potencia los efectos de éste último.

1.2.1.4.2. Antagonistas de la respuesta de ampliación

La sobrecarga de calcio intracelular es el factor más importante en la muerte neuronal por isquemia. Los efectos protectores de los bloqueantes de los canales de calcio como la flunaricina (Takahashi, 1992), producen atenuación de la neurotoxicidad producida por el glutamato, aunque en pequeño grado, pero pueden ser sinergistas en su acción cuando se administran junto con antagonistas NMDA (Choi, 1990).

1.2.1.4.3. Antagonistas de la respuesta de expresión

Para evitar los efectos neurotóxicos que ocurren en esta fase habría que recurrir a bloqueantes de enzimas catabólicas causantes de la degradación celular o a sustancias que eliminen los radicales libres, como veremos a continuación.

1.2.2. Producción de radicales libres

Junto con los efectos neurotóxicos desencadenados por la acción del glutamato, la formación de radicales libres derivados del oxígeno que se generan durante la fase de reperfusión postisquemia (McCord, 1985) contribuye al daño

celular ocasionado por la isquemia (Siesjö, 1981; Pellegrini- Giamprieto, 1990; Ophir y cols, 1993).

1.2.2.1. Concepto de radical libre

Radical libre es cualquier átomo, grupo de átomos o moléculas con un electrón desemparejado ocupando su órbita externa (McCord, 1985). Como consecuencia de ello son extraordinariamente inestables y reaccionan con otras moléculas. Entre los radicales libres, los más importantes implicados en el daño tisular son el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), el anión superóxido ($\cdot\text{O}_2^{\ominus}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el óxido nítrico (NO_2). Aunque el peróxido de hidrógeno no tiene un electrón desapareado, puede participar en formación de moléculas cuya descomposición da lugar a radicales libres. Otros elementos con las mismas características son el oxígeno molecular (O_2), el ozono (O_3) y el ácido hipocloroso (HOCl) (Thomas y Aust, 1989).

1.2.2.2. Formación fisiológica de radicales libres y mecanismos de defensa

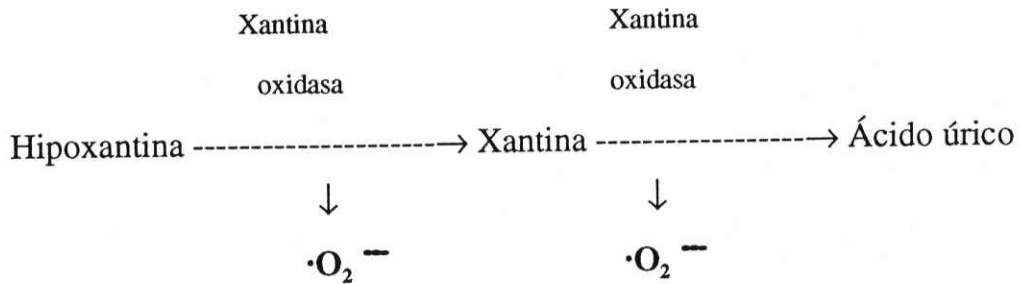
La producción fisiológica de radicales libres está asociada al metabolismo celular del oxígeno y a las reacciones de oxi-reducción. Una de las fuentes más importantes de producción es la cadena respiratoria (McCord y Fridovich, 1978). El organismo en condiciones fisiológicas evita la potencial toxicidad de los radicales mediante un sistema de defensa enzimático que actúa en los lugares de su producción. Entre los sistemas de defensa enzimáticos más importantes podemos citar la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa, y la glutatión reductasa. Si los sistemas de defensa enzimáticos son desbordados, se producirá un acúmulo de radicales libres no neutralizados capaces de desarrollar actividad citotóxica (Ernster, 1988).

1.2.2.3. Mecanismos de producción de los radicales libres durante la reperfusión postisquemia.

Como hemos visto, el acúmulo de calcio intracelular va a desencadenar la activación de determinadas enzimas cuya acción va a ser lesiva para la célula. En concreto, la activación de la fosfolipasa A por este mecanismo calcio dependiente, conlleva a la peroxidación de los lípidos de las membranas celulares. Estos lípidos son los precursores del ácido araquidónico, por lo que sus niveles extracelulares son considerablemente elevados durante la isquemia (Siesjö, 1981). Las altas concentraciones de ácido araquidónico favorece liberación de aminoácidos excitadores y disminución de la recaptación de glutamato en la terminal presináptica (Yu y cols., 1986).

Durante la reperfusión, es decir, en presencia de oxígeno, se produce una rápida utilización de ácidos grasos libres, en particular del ácido araquidónico, ya que se metaboliza por la acción de enzimas como la lipo-oxigenasa y ciclooxigenasa, con formación de leucotrienos, prostaglandinas, tromboxano y anión superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$) (Arnstead y cols., 1988).

Además, procedente de la degradación del ATP (adenosín trifosfato) durante la isquemia, se produce un acúmulo de hipoxantina ($\text{ATP} \rightarrow \text{ADP} \rightarrow \text{AMP} \rightarrow \text{AMP} \rightarrow \text{Adenosina} \rightarrow \text{Inosina} \rightarrow \text{Hipoxantina}$). En presencia de oxígeno, como ocurre en la reperfusión, la enzima xantina oxidasa convierte la hipoxantina en xantina y a ésta en ácido úrico, produciendo radicales superóxido como subproductos (Mc Cord, 1985, Pellegrini-Giamprieto y cols., 1990).



Mecanismo propuesto para la producción de superóxido inducido por la isquemia. (McCord, 1985)

Otra fuente de producción de radicales libres proviene de la formación de óxido nítrico a partir de la arginina, metabolismo estimulado por activación de los receptores NMDA por el glutamato. En condiciones normales el óxido nítrico no es tóxico, aunque en presencia del anión superóxido durante la reperfusión, puede conllevar a la formación de radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) (Schmidt y cols., 1988).

También hay evidencia de que los leucocitos PMN contribuyen a la lesión en el cerebro por efecto de la isquemia-reperfusión. Se ha propuesto (Hallenbeck y cols., 1986) que los leucocitos que quedan atrapados en el interior de los vasos en el momento que cesa la circulación sanguínea por isquemia, pueden liberar factores quimiotácticos (ej: leucotrienos) durante la reperfusión, interactuando con las plaquetas en la liberación de ácido araquidónico. Este ácido araquidónico contribuiría a estimular la liberación de glutamato y a aumentar la producción de radicales libres como consecuencia de su metabolismo a través de las enzimas oxigenasas como antes ya se ha mencionado.

1.2.2.4. Toxicidad por radicales libres

Los radicales libres presentan una importante reactividad biológica. Los radicales hidroxilo tienen una alta capacidad para reaccionar con todo tipo de moléculas celulares: polisacaridos, proteínas y fosfolípidos, ADN y ácidos

orgánicos (Halliwell y Gutteridge, 1984). Los radicales hidroxilo, sin embargo, son más reactivos que el superóxido, pero menos específicos en el tipo de molécula que ataca (Traymann y cols., 1991). El fenómeno de peroxidación de los lípidos de la membrana celular secundaria a la acción del ión hidroxilo y superóxido, se incrementa en presencia del ión ferroso (Traymann y cols., 1991). De hecho, la utilización de quelantes del hierro como la desferroxiamina protege a la retina tras la lesión isquémica (Gehlbach y Purple, 1994).

1.2.2.5. Métodos para antagonizar la toxicidad de los radicales libres

1.2.2.5.1. Administración exógena de enzimas neutralizantes

Los sistemas enzimáticos presentes en el organismo para eliminar la producción fisiológica de radicales libres están formados por enzimas como la *SOD* (superóxido dismutasa) y la *catalasa* (Leninger, 1978). Son enzimas protectoras, ubicuamente distribuidas en las células animales. La *SOD* cataliza reacciones que neutralizan el superóxido, y la *catalasa* el peróxido de hidrógeno (McCord, 1985).

Se han realizado gran número de estudios al respecto en retinas sometidas a isquemia (Szabo y cols., 1992; Nayak y cols., 1993; Ohtsuki y cols., 1993), evidenciándose sus efectos protectores por bloqueo enzimático en la producción de radicales libres, cuando son administradas exógenamente. Es de destacar que estas enzimas no tienen capacidad para atravesar las membranas celulares y, sin embargo, su efecto protector sobre los tejidos sometidos a isquemia son evidentes. Una posible explicación (Nayack y cols., 1993), es que el oxígeno reactivo se produzca en primer lugar en el endotelio vascular liberándose al interior de los vasos, lugar donde las enzimas protectoras están disponibles.

Otras sustancias consideradas con efecto protector frente a la presencia de los radicales libres son el dimetilsulfóxido (DMSO), considerado como un excelente "limpiador" del radical hidroxilo. Se ha observado que su administración antes de la reperfusión, reduce el daño neurológico en la médula espinal secundario a la isquemia (Coles y cols., 1986). Otras moléculas implicadas con efecto neuroprotector son, el EGB-761, neutralizante que se ha mostrado efectivo administrado en el momento de la reperfusión (Szabo y cols., 1992); la trimetazidina, droga antianginosa y antiisquémica, utilizada en el tratamiento de las enfermedades isquémicas, posee una acción neutralizante frente al anión superóxido y el radical hidroxilo (Guarnieri y Muscarini, 1989), aunque no se conoce bien su mecanismo de acción, y el alfa-tocoferol, un antioxidante de membranas que administrado antes de la isquemia disminuye la peroxidación lipídica durante la reperfusión (Yamamoto y cols., 1983). El alfa-tocoferol interviene en los mecanismos fisiológicos de protección local del organismo contra los ataques de los radicales libres (Bron y cols., 1995).

Los bloqueantes de la xantina oxidasa, como el alopurinol, actúan interfiriendo en la formación de ácido úrico y superóxido. Su efecto neuroprotector en la retina ha sido estudiado con resultados contradictorios. En estudios histológicos de retinas sometidas a isquemia-reperfusión en animales tratados previamente con alopurinol, Faberowski (1989) no ha encontrado efectos neuroprotectores de esta sustancia, cuando somete a la retina a periodos de isquemia de 60 ó más minutos. Sin embargo, otros autores (Peachey y cols., 1993) han estudiado la recuperación de la respuesta electrofisiológica de la retina en ojos enucleados y perfundidos con medios que contenían alopurinol, habiendo observado una respuesta más óptima en las sometidas a tratamiento que en las controles.

Otra posibilidad terapéutica reside en las drogas antiinflamatorias no esteroideas que actúan inhibiendo la actividad ciclo-oxigenasa, y por ende evitando la formación de ácido araquidónico, suprimiendo de la liberación de los radicales libres que de él se derivan (Ascher y Novwack, 1988).

1.2.3. Otros factores que pueden neutralizar los efectos de la isquemia

Los factores de crecimiento (FC) se han definido clásicamente como unas proteínas endógenas, producidas en los territorios de inervación de determinadas poblaciones neuronales, que juegan un papel crucial en la supervivencia y crecimiento de éstas, y en el refinamiento de las conexiones sinápticas durante el desarrollo del SNC (Purves, 1986). Estos factores de crecimiento se han identificado clásicamente por su capacidad para promover en cultivo la supervivencia y crecimiento neurítico de determinados grupos neuronales.

Además de este papel que juegan durante el desarrollo, se piensa que los FC promueven la supervivencia neuronal y el mantenimiento y plasticidad de conexiones sinápticas en el SNC maduro o adulto (Purves, 1986; Thoenen, 1991; Hefti y cols., 1989). Más recientemente se comienza a aceptar que los FC juegan también un papel importante en la protección neuronal contra insultos de diversa índole, a saber; la hipoglicemia, la hipoxia, la excitotoxicidad y la presencia de radicales libres, así como en la deprivación trófica de las neuronas desde sus territorios diana. Estos insultos se presentarían en situaciones de traumatismos, isquemia, y otras enfermedades de tipo neurodegenerativo (Mattson y cols., 1993). El papel protector de los FC frente a estos insultos consistiría en la estabilización del calcio intracelular $[Ca^{2+}]_i$ y en la supresión de sistemas de radicales libres.

En experimentos in vitro se ha documentado que algunos FC pueden proteger las neuronas de situaciones experimentales similares a la isquemia,

como es la privación de glucosa y la hipoxia (Mattson y Cheng, 1993). Experimentos *in vivo* han documentado también que el NGF (Factor de Crecimiento Nervioso) puede proteger neuronas del hipocampo contra la isquemia (Nozaki y cols., 1993; Cheng y Mattson, 1991, 1992; Shigeno y cols., 1991; Gluckman y cols., 1992).

Los FC parecen actuar estabilizando la homeostasis del $[Ca^{2+}]_i$. En experimentos en los que se midió directamente el $[Ca^{2+}]_i$ con el marcador fluorescente fura-2, se observó que si se pretrataban neuronas del hipocampo con el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) la respuesta de neuronas de hipocampo a incrementos de la concentración de Glutamato se atenuaban (Mattson y cols., 1989). Además en condiciones de hipoxia y privación de glucosa los FC también atenuaban los incrementos de $[Ca^{2+}]_i$ (Cheng y Mattson, 1991; Mattson y Cheng, 1993). Uno de los mecanismos por los que se piensa que los FC pueden estabilizar el $[Ca^{2+}]_i$ ha sido sugerido en experimentos que muestran que el bFGF suprime la expresión de una proteína de 71 kDa que forma parte junto con otras tres proteínas del receptor funcional del NMDA (NMDARP-71) (Kumar y cols., 1991). Las respuestas de la $[Ca^{2+}]_i$ inducida por NMDA se atenuaba en neuronas cultivadas con oligonucleótidos antisentido que reducen los niveles de NMDARP-71 (Mattson y cols., 1993; Kumar y cols., 1992). Por otra parte se ha correlacionado la expresión de la proteína de 28kDa ligante de calcio calbindina con una resistencia incrementada a la excitotoxicidad, y la expresión de esta proteína parece verse influenciada por la neurotrofina-3 (NT-3), por el bFGF y por el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) (Collazo y cols., 1992). Por último, se piensa que el mecanismo de actuación de los FC implica la activación de tirosin-quinazas que, a su vez, activan genes inmediatos, y los productos transcripcionales de éstos serían los responsables de la actividad neuroprotectora de los FC. Los FC también parecen ejercer un papel protector contra la génesis de radicales libres. Varias fuentes han documentado

que el NGF puede proteger células PC-12 del daño causado por el peróxido de hidrógeno y que el NGF puede incrementar in vivo los niveles de superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa (enzimas antioxidantes) y prevenir la disminución de la actividad catalasa que ocurre como consecuencia de la edad en rata.

1.2.4. Otros mecanismos mediadores de la lesión isquémica.

Recientemente, se ha implicado una citoquina inflamatoria, la interleukina-1 (IL-1), en la lesión cerebral causada por la isquemia. En efecto, Hangay y cols. (1995) han estudiado los niveles de expresión del gen de la IL-1 en un modelo de isquemia transitoria de la retina y han documentado que la expresión del gen de la IL-1 no se produce si no se permite la reperfusión tras isquemia. Si la reoxigenación se produce el gen comienza a expresarse de una a tres horas después de finalizar la isquemia, hecho que consideran un importante hallazgo ya que indica la probable implicación de la IL-1 en el daño retiniano durante las fases precoces de la reperfusión.

1.2.5. Estudio comparativo de la tolerancia a la isquemia entre cerebro y retina

La retina es considerada como un extensión del sistema nervioso central. En condiciones de isquemia tanto en el cerebro como en la retina, se produce una rápida deplección celular de las reservas de glucosa y oxígeno almacenadas, vitales para mantener su normal metabolismo. Se desarrolla así un metabolismo en condiciones anaerobias, que cuando ya no es capaz de aportar los requerimientos metabólicos adecuados se manifestará clínicamente por la pérdida

de la consciencia, si el accidente vascular ocurre en el cerebro o con pérdida de visión si la isquemia se produce en la retina. Aunque hasta este momento ambos órganos se comportan de forma similar, la aparición del concepto de irreversibilidad en cada uno de ellos va a ser diferente.

Aunque los resultados obtenidos en animales de experimentación (monos ardilla) no son directamente extrapolables al ser humano, se conoce que la detención aguda del flujo sanguíneo a través de la arteria central de la retina provoca la abolición del electroretinograma en los primeros 90 segundos (Hamasaki y Kroll, 1968), pero si se permite la revascularización incluso después de 2 a 2,5 horas de isquemia retiniana, se recupera la actividad eléctrica a niveles normales. Sin embargo, en el cerebro tiempos de isquemia superiores de 3 a 7 minutos pueden llegar a producir una muerte neuronal irreversible (Kabat y cols., 1941).

Se especula acerca de los factores que pueden condicionar la mayor tolerancia de la retina a la isquemia. Se ha implicado al vítreo, por ser un medio que rodea la retina y tener una concentración en glucosa tres veces superior a la propia retina (Weiss, 1976). De hecho, la utilización de dextrosa al 5% en cámara anterior para provocar incremento de la presión intraocular e isquemia retiniana, en lugar de suero salino 0,9%, ha mostrado tener efectos protectores sobre la lesión isquémica, probablemente producido porque la dextrosa difunde desde cámara anterior hacia cámara vitrea y sirve de reserva energética a la retina (Büchi y cols., 1991). De la misma manera, se argumenta que el vítreo puede ser una fuente de oxígeno y desempeñar un papel importante en la tolerancia de la retina a la isquemia, aunque los bajos niveles de oxígeno en este medio hacen cuestionable esta hipótesis (Hayreh y Weingeist, 1980b).

Hayreh y Weingeist (1980b) han revisado los factores que pueden estar implicados en que el cerebro tenga una menor tolerancia a la isquemia que la retina. Uno de los factores mencionados es la formación de un edema tisular secundario a la isquemia. Cuando esto ocurre en el cerebro, como es un órgano que no puede expandirse al estar contenido en una estructura ósea indeformable, se produce un colapso de la microvascularización por el incremento de la presión intracraneal, agravando aún más la situación. Sin embargo, la retina es un tejido que aunque se edematice puede regular su presión sin compromiso de la microcirculación retiniana. Otros factores implicados, pueden ser la viscosidad sanguínea en los vasos cerebrales resultante del paso de fluidos al espacio intercelular como consecuencia del edema producido.

Hayreh y Weingeist, (1980b) también han sugerido que la susceptibilidad de las neuronas cerebrales a la isquemia sea mayor que las de la retina. Una de las razones que se ha argumentado para explicar esta hipótesis, sería el diferente grado de recambio de proteínas de cada tipo neuronal, de manera que las de más alta actividad metabólica sufrieran más precozmente lesión ante una situación de isquemia. En la retina, existe evidencia en el gato de que entre los diversos tipos de células ganglionares existe diferente susceptibilidad al aumento de la presión intraocular (Grehn y Prost, 1983). Las células de tipo Y (células grandes, intermediario de los bastones, axones de gran diámetro y campos receptivos grandes) han mostrado una mayor tolerancia que las células de tipo X (células pequeñas, intermediario de los conos, con campos receptivos pequeños, axones de poco diámetro y concentradas en la parte central del campo visual) (Méndez y Demicheli, 1992). Éstas últimas cesan su función ante niveles moderadamente altos de presión intraocular (Shou y Zhou, 1989). Más recientemente, Dreyer y cols., (1994) han sugerido en experimentos realizados in vivo e in vitro, que en la rata, las CGR de tipo grandes, son más susceptibles a la lesión iducida por glutamato.

1.2.6. Muerte celular producida por isquemia-reperfusión de la retina.

Aunque se puede considerar que han sido identificados gran parte de los eventos metabólicos que conllevan a la degeneración y muerte de la célula nerviosa, sigue siendo un punto controvertido definir cual es la disfunción celular específica por la que se considera que la lesión es ya irreversible.

La disminución intensa y mantenida en el tiempo del aporte sanguíneo, superior al umbral que es capaz de soportar un determinado tejido conlleva a una lesión celular en la que se producen cambios irreversibles en las células, tras los cuales no se puede mantener ninguna función elemental como la respiración o la permeabilidad selectiva de las membranas. El tipo de muerte celular así producida se denomina *necrosis*, y su identificación se realiza por las alteraciones secundarias que se observan en el examen histológico. La necrosis no es específica de la lesión celular por isquemia, ya que también la provocan otros agentes lesivos como infecciones celulares, toxinas, alteraciones de la membrana celular por el complemento, productos químicos y fenómenos físicos como el calor o las radiaciones (Anderson, 1979) .

El mecanismo esencial que desencadena la necrosis se caracteriza por una alteración de la permeabilidad de membrana con pérdida del control de su volumen celular, iniciado o perpetuado por la falta de energía celular, que conlleva a un edema mitocondrial con desarrollo de densidades en la matriz mitocondrial características, degeneración y ruptura de las membranas lisosomales y citoplasmáticas con autólisis celular. La necrosis afecta a grupos celulares y normalmente se produce una reacción inflamatoria que se intensifica por la liberación al medio extracelular de compuestos citotóxicos provocado por la desintegración de las membranas celulares (Wyllie y cols., 1980).

Frente a este tipo de muerte por necrosis se han definido otro tipo de alteraciones en la ultraestructura celular muy bien caracterizadas conocidas con el nombre de muerte celular por *apoptosis*. La apoptosis es un mecanismo de muerte suicida, que ocurre durante el desarrollo del SNC (muerte neuronal programada) y también en situaciones de compromiso celular, que formaría parte de los mecanismos de homeostasis tisular. La apoptosis supone la ejecución de un programa genético en el que se producen tres mecanismos celulares: i) Requiere la síntesis activa de "novo" de ARN y proteínas; ii) La activación de endonucleasas en el núcleo celular que da lugar a una fragmentación no randomizada internucleosomal del ADN, y; iii) La alteración de la expresión de carbohidratos de superficie, que pueden ser responsables del reconocimiento en la fagocitosis de las células apoptóticas (Wyllie y cols., 1984; Wyllie, 1985; Walker y cols., 1988).

La apoptosis se caracteriza por una condensación de la cromatina, fragmentación intracelular asociada con fragmentos celulares encapsulados por membrana (cuerpos apoptóticos) y la fragmentación internucleosomal del DNA (Wyllie y cols., 1984; Kerr y cols., 1972; Ellis y cols., 1991). La fagocitosis de las células que sufren apoptosis se realiza fundamentalmente por células del tejido circundante en ausencia de reacción inflamatoria. A diferencia de la necrosis, la apoptosis afecta a células aisladas en un determinado tejido (Wyllie y cols., 1980). A nivel molecular, se ha producido un progreso significativo en comprender las bases genéticas de la apoptosis (William y Smith, 1993).

1.2.6.1. Evidencia de apoptosis tras la lesión de las CGR por axotomía o isquemia.

Estudios recientes han implicado la apoptosis en la muerte de CGR tras la axotomía y tras la isquemia. Se han realizado estudios ultraestructurales en retinas sometidas a fenómenos de compresión del nervio óptico (Barron y cols.,

1986) y axotomía (Berkelaar y cols., 1984; García Valenzuela y cols., 1994) en las que se sugieren que en la muerte de CGR inducida por la axotomía, el tipo de muerte neuronal predominante es la apoptosis.

Recientemente Quigley y cols. (1995) y García-Valenzuela y cols. (1995) han estudiado el tipo de muerte de CGR inducido por aumentos moderados pero prolongados de la presión intraocular, semejantes a la situación del glaucoma y han sugerido que la apoptosis es el tipo predominante de muerte neuronal.

Büchi (1992a) utilizando técnicas morfológicas ultraestructurales también identificó cambios morfológicos celulares similares a los de la apoptosis, y señala a ésta como uno de los tipos de muerte responsables de pérdida de CGR tras la isquemia transitoria completa de la retina de la rata adulta producida por incrementos de la presión intraocular.

En la explicación de este fenómeno tanto en axotomías como en condiciones de elevación de la presión intraocular, se ha implicado la interrupción en la llegada de factores tróficos desde las terminaciones axonales de las CGR en el SNC hasta el citoplasma celular (Quigley y cols., 1995), bien sea por la sección de las fibras del nervio óptico como en la axotomía o por un bloqueo del flujo axoplásmico provocado por niveles altos de presión intraocular (Anderson y cols., 1974; Quigley y Anderson, 1976; Minckler y cols., 1977; Quigley y cols., 1981). Esta explicación se basa en la llamada hipótesis neurotrófica que sugiere que los factores secretados por los territorios de inervación son importantes para la supervivencia de las neuronas aferentes (Cowan y cols., 1984; Barde, 1989).

Esta hipótesis se ve corroborada por estudios realizados administrando factores neurotróficos intraoculares tras la sección del nervio óptico, en los que se aprecia un efecto neuroprotector sobre las CGR (Mey y Thanos, 1993; Mansour-Robaey y cols., 1994; Peinado y cols., 1995).

Estas observaciones pueden tener una gran trascendencia por dos motivos principales: i) En una gran parte de los estudios que encontramos en la literatura sobre lesión isquémica de la retina se utiliza el incremento de la presión intraocular como modelo de obstrucción del flujo sanguíneo retiniano, lo que podría estar provocando una lesión sobreañadida a los efectos lesivos de la isquemia propiamente dicha; ii) En los incrementos de presión intraocular moderados pero dilatados en el tiempo, como ocurre en el glaucoma crónico, estos hallazgos abren una nueva perspectiva para entender los mecanismos etiopatogénicos y buscar nuevas soluciones terapéuticas eficaces.

1.3. TÉCNICAS EXPERIMENTALES PARA LA OBTENCIÓN DE ISQUEMIA RETINIANA.

La obstrucción de la arteria central de la retina en el ser humano, es un cuadro clínico dramático, debido a la rapidez en su instauración y a la gravedad de las posibles secuelas visuales. Se manifiesta con una pérdida repentina y no dolorosa de la visión. La detención del flujo arterial retiniano está provocado por embolos (causa más frecuente de obstrucción de la circulación retiniana) procedentes del corazón o de una placa de ateroma desprendida, por vasoobliteración (placas de ateroma, arteritis), por incremento de la presión intraocular (glaucoma agudo de ángulo cerrado), o por presión externa excesiva sobre el globo ocular (hematomas retrobulbares, durante la cirugía del desprendimiento de retina, o en procedimientos neuroquirúrgicos; Kanski, 1989).

Aunque la obstrucción arterial puede producirse en una de las ramas de la arteria central de la retina provocando una afectación vascular parcial, en la mayor parte de los casos (aprox. 60%) se ve afectada la arteria central de la retina (Sanborn y Magargal, 1990).

La oclusión de la arteria central de la retina provoca un infarto de las capas retinianas que dependen de ella para su nutrición, esto supone la afectación de los dos tercios internos de la retina (capa de células ganglionares, capa plexiforme interna, capa nuclear interna, y capa plexiforme externa), dejando intactas las capas más externas (nuclear externa, fotorreceptores y epitelio pigmentario) que dependen de la circulación coroidea.



Las importantes repercusiones visuales que provoca este accidente vascular justifican los numerosos trabajos de investigación dirigidos a estudiar la sensibilidad de las CGR, así como del resto de capas de la retina sometidas a diferentes tiempos de isquemia; tanto desde el punto de vista morfológico como funcional. Una de las dificultades a la hora de estudiar la isquemia retiniana es desarrollar un modelo experimental fiable, reproducible y que se asemeje en lo máximo posible a la situación en el ser humano. En la bibliografía encontramos descritas numerosas técnicas para obtener una detención del flujo sanguíneo retiniano, pero la mayoría de ellas, consiguen una afectación no sólo de la irrigación retiniana sino también de la coroidea. Entre las técnicas que se han desarrollado para inducir experimentalmente la isquemia de la retina destacamos, las reversibles, es decir, las que una vez finalizado el tiempo de isquemia deseado se permite la reperfusión retiniana; e irreversibles, aquellas en las que el bloqueo de la circulación se mantiene hasta el sacrificio del animal.

1.3.2. Técnicas reversibles de isquemia retiniana

Las técnicas desarrolladas para inducir una isquemia transitoria o reversible de la retina se basan principalmente en aumentar la presión intraocular por encima de los valores sistólicos, en la disección y ligadura de los vasos sanguíneos retrobulbares que se dirigen a irrigar la retina, o en la compresión o coagulación intraocular de las arterias retinianas.

1.3.2.1. Por incremento de la Presión Intraocular (PIO).

Es una de las técnicas experimentales más utilizadas. La circulación retiniana, en condiciones normales se produce por la diferencia o gradiente de presión entre la presión de la arteria central de la retina y la presión de la vena central de la retina. Este gradiente se ve influenciado por la presión intraocular,

que habitualmente permanece constante alrededor de 10-15 mm Hg. Si incrementamos mecánicamente los valores de presión intraocular por encima de los valores de presión arterial sistólica, provocamos una obstrucción al flujo sanguíneo arterial.

La circulación retiniana ocurre en el interior de una cavidad cerrada, en un órgano cuyas paredes son prácticamente inextensibles, ésto hace que cualquier incremento de la presión en cámara anterior o en cámara vítrea se transmita uniformemente a través de todas las capas del globo ocular. La consecuencia inmediata de un aumento de la presión intraocular por encima de los valores sistólicos, es la detención del flujo sanguíneo retiniano y coroideo, y con ello la afectación isquémica de la retina en todo su espesor y no sólo de los dos tercios internos de la retina de los que depende la circulación a expensas de la arteria central de la retina.

Las técnicas descritas en la literatura para incrementar la presión intraocular son varias: Por una parte aquellas que inducen un incremento de la presión intraocular introduciendo una aguja fina (21-27 G) a través de córnea hasta cámara anterior, fijada con alguna sustancia, como el cemento de cianocrilato y conectada a un sistema que permite mantener la presión hidrostática deseada a través de un reservorio de suero salino 0,9% (Reinecke, 1962; Anderson y Davis., 1975; Siliprandi y cols., 1988; Yoon y Marmor, 1989; Büchi, 1992a; Büchi, 1992b., Louzada-Junior, 1992; Takahashi y cols., 1992; Nayak, 1993).

Otros autores prefieren inyectar aire conectando la aguja o cánula a un manómetro (Johnson, y Foulds., 1978; Neetens y cols., 1981), ya que evitan complicaciones derivadas de la presurización con una columna de suero salino como es el edema tisular y la hemorragia.

En otras ocasiones el incremento de la PIO se hace a través de la cámara vítrea, en este caso la aguja o cánula utilizada se dirige a cámara vítrea a través de pars plana e inyectando suero salino, conectando la aguja a columna de presión hidrostática (Melamed y cols., 1981; Tsukahara y cols., 1992).

Por último, se puede efectuar mediante el sistema de la copa de succión. Se trata de un aparato que acoplado al ojo del animal o de la persona crea un vacío por succión que provoca un aumento de la presión intraocular. Este sistema se ha utilizado en animales de experimentación en el que el tamaño de sus ojos permiten su uso, como conejos (Veriac y cols., 1993), aunque también se ha utilizado en humanos (Sipperley, 1973) durante cortos periodos de tiempo, para estudiar las modificaciones de la respuesta eléctrica de la retina a incrementos de presión intraocular. Entre las ventajas que ofrece esta técnica cabe destacar: i) La facilidad de utilización. ii) La posibilidad de monitorizar la presión intraocular a la que se somete el ojo mediante una columna hidrostática o un manómetro. iii) La posibilidad de comprobar mediante observación del fondo de ojo la presencia o ausencia de flujo sanguíneo retiniano. iv) Ser fácilmente reproducible.

Sin embargo esta técnica no está exenta de desventajas. Una de ellas es la alteración de las estructuras del globo ocular derivadas a la inserción de la aguja a través de la córnea o cuerpo ciliar. Es relativamente fácil provocar lesiones que conlleven la pérdida de transparencia de los medios, como la lesión del cristalino y el sangrado del iris o de la retina, que impide la visualización del fondo de ojo. A la vez se desencadena una reacción inflamatoria provocada por la presencia hemática; así como, por la propia manipulación experimental.

Estos métodos que se basan en la introducción de una aguja en la cámara anterior o posterior del ojo son invasivos e inducen un fenómeno inflamatorio ocular importante. En la actualidad, las repercusiones de este efecto inflamatorio, son objeto de estudio en varios laboratorios (Berkelaar y cols., 1994). Una de las consecuencias más importantes derivadas de la punción del globo ocular es un efecto neuroprotector inespecífico sobre las células ganglionares lesionadas. En nuestro laboratorio (Peinado y cols., 1995; Sellés y cols., observaciones no publicadas) y en otros (Bekelaar y cols., 1994) se ha documentado que la punción del globo ocular por la parte anterior o posterior del globo desencadena por un mecanismo probablemente inflamatorio, un efecto neuroprotector que incrementa sensiblemente la supervivencia de las CGR axotomizadas o sometidas a isquemia. Este aspecto, muy interesante desde el punto de vista biológico, dificulta sin embargo la interpretación de los resultados en estudios de isquemia y supervivencia neuronal de la retina.

Otro punto más cuestionable, es la posibilidad de que las lesiones halladas en el tejido retiniano analizado puedan deberse a una sumación de efectos isquémicos y mecánicos, provocados éstos últimos, por las cifras de presión intraocular tan elevadas (110-125 mm Hg) durante el tiempo que se mantiene la isquemia. A este respecto se ha investigado si la presencia y grado de bloqueo del flujo axonal se relaciona más con el nivel de presión intraocular (lo que sugeriría un bloqueo mecánico) o con la presión de perfusión (lo que sugeriría un mecanismo isquémico; Hayreh y March, 1979), no encontrándose evidencias concluyentes de la influencia mecánica ejercida por la presión sobre la lesión retiniana.

No obstante, estudios recientes han documentado que se observa lesión de los axones de las CGR producido por incremento mantenido de la PIO en niveles inferiores a la presión sistólica del animal (Quigley y cols., 1995), que

no bloquean la circulación sanguínea. Se ha postulado que en el glaucoma se ve comprometido el flujo axonal, lo que impediría el transporte axonal retrógrado de señales neurotróficas procedentes del tejido diana en el sistema nervioso central, emulando los efectos de una axotomía (Quigley y cols, 1995).

1.3.2.2. Abordaje de vasos oculares a nivel retobulbar

El abordaje del espacio retobulbar bien mediante orbitotomía o bien mediante cantotomía y disección conjuntival permite visualizar y manipular la vascularización de la que depende la irrigación del globo ocular para inducir una isquemia transitoria de la retina.

1.3.2.2.1. Disección y clampaje de la arteria central de la retina

La disección y clampaje selectivo de la arteria central de la retina (ACR) en monos ha sido utilizada por diversos autores (Hayreh y March., 1979; Hayreh y cols., 1980; Kroll, 1968). Mediante una orbitotomía y con ayuda de un microscopio operatorio exponen la ACR y la separan de la vena central de la retina y de la vaina del nervio óptico cerca de la esclera, sin implicar a otros vasos oculares (vena central de la retina y arterias ciliares anteriores y posteriores). El microclampaje de la ACR permite obtener un bloqueo selectivo de la circulación retiniana en el ojo del animal sin afectar la circulación coroidea, permitiendo tras un intervalo de tiempo determinado la reperusión retiniana cuando se libera la compresión. Este tipo de modelo experimental realizado en monos, se asemeja más al accidente vascular arterial en humanos, ya que la isquemia que produce es selectiva para las capas internas de la retina que dependen para su nutrición de la ACR.

1.3.2.2.2. Compresión de toda la vascularización ocular

Otros autores (Fujino y Hamasaki., 1965; Stefánsson, 1988; Szabo y cols., 1992; Bron, 1995) describen su técnica situando una sutura por detrás del globo ocular, atravesando con la aguja el tejido graso retrobulbar y ligando el nervio óptico y toda la vascularización que llega al globo ocular alrededor de las vainas que recubren al mismo.

En este caso se produce una isquemia global del globo ocular, pero sin embargo este tipo de abordaje experimental induce además de la isquemia retiniana, una "axotomía" por compresión de la totalidad de las fibras nerviosas provocando lesiones sobre las CGR añadidas a las meramente inducidas por la isquemia, y obscureciendo de este modo la interpretación de los resultados en este tipo de experimento. La axotomía de las fibras del nervio óptico induce en el plazo de 12 días la pérdida de aproximadamente el 80% de la población original de CGR (Peinado y cols., 1995; Berkelaar y cols., 1994)

1.3.2.3. Compresión directa sobre las arterias retinianas

También se ha descrito la oclusión de la vascularización retiniana en ojos de gato por presión directa sobre el nervio óptico y sus márgenes con una cánula de cristal introducida en cavidad vítrea y dirigida desde fuera (Ben-Nun y cols, 1988). La salida de vítreo a través de la esclerotomía con la consiguiente hipotonía ocular, el sangrado en retina en la zona donde presionan el vaso y el desprendimiento de retina con colección hemática subretiniana son complicaciones inherentes a este modelo de isquemia retiniana (Ben-Nun y cols., 1988).

Además hay que tener en cuenta el daño directo sobre las fibras nerviosas de la cabeza del nervio óptico sobre las que se ejerce una compresión directa.

1.3.3. Técnicas irreversibles de isquemia retiniana

Se han desarrollado modelos de isquemia retiniana permanente, por las características de la técnica utilizada; es decir, la isquemia es irreversible hasta el sacrificio del animal. Se han utilizado en experimentos en los que se pretendía investigar los efectos inmediatos de la isquemia retiniana. En este tipo de experimentos, al no permitirse la reperfusión retiniana tras la isquemia, se impide el desarrollo de la lesión isquémica por reperfusión (ver anteriormente), por lo que la lesión no debe ser comparada a la estudiada con los métodos reversibles de detención del flujo sanguíneo retiniano.

1.3.3.1. Fotocoagulación de los vasos retinianos

La obliteración de las arterias retinianas por algún medio físico es utilizada por diversos autores (Reinecke, 1962; Ikeda, y cols., 1992). La fotocoagulación con laser de los vasos retinianos produce el cierre de su luz con la consiguiente obstrucción circulatoria. Esta técnica permite cerrar selectivamente un vaso retiniano provocando isquemias parciales y permanentes de regiones sectoriales de la retina.

1.3.3.2. Obstrucción de la circulación retiniana con microesferas

Se han utilizado micropartículas de latex (Collier, 1967), inyectadas directamente en las venas vorticosas, provocando su liberación retrógrada, embolizando los vasos coroideos, sin afectar la circulación retiniana. Con otras sustancias como el talco administrado por vía intravenosa (Kaga y cols., 1982) se consigue la obliteración de los vasos coroideos y retinianos, por diferentes mecanismos, que permiten el estudio de los fenómenos isquémicos derivados de la ausencia de nutrición en las capas de la retina. También se ha utilizado como

método de obtener isquemia retiniana, el embolismo con sustancias grasas en la arteria carótida (Reinecke, 1962).

1.3.3.3. Clampaje vascular extraocular

Para obtener la isquemia generalizada del globo ocular así como del nervio óptico, en ratas, se han utilizado técnicas más drásticas como es el clampaje de las arterias carótidas bilaterales y la coagulación de las arterias vertebrales mediante diatermia (Sano y cols., 1992). Esta técnica aunque evita la invasión directa del globo ocular o de su vascularización a nivel retrobulbar, es evidente que provoca daño isquémico simultáneo e irreversible en el SNC del animal por lo que habría que replantear sus ventajas frente a otras técnicas menos lesivas.

1.4. ISQUEMIAS RETINIANAS: ESTUDIOS PREVIOS

El estudio de la isquemia retiniana ha sido objeto de numerosos trabajos experimentales orientados a conocer tanto las alteraciones morfológicas como funcionales que de ella se derivan. Se han investigado los efectos de la isquemia sobre la retina en diferentes especies de animales de experimentación, y aunque los resultados no son extrapolables al ser humano nos pueden dar una visión en conjunto de cuales son los límites de tolerancia de la retina a la isquemia, qué capas de la retina son las más susceptibles, o si los hallazgos histológicos y funcionales son paralelos.

Las estudios experimentales que más se asemejan a la situación clínica de obstrucción de la arteria central de la retina que presenta el ser humano, son probablemente los realizados en monos, por dos razones fundamentales, por una parte la retina y su vascularización es similar en estos animales a la del hombre y por otra, en estos animales se ha conseguido disecar y aislar la arteria central de la retina, ligándola de forma aislada, con lo que se respeta el resto de vascularización de la que depende las partes más externas de la retina, la coroides. Se obtienen así isquemias selectivas de la capa interna de la retina y no de todo el espesor retiniano como ocurre con otros métodos de producción de isquemia retiniana frecuentemente utilizados (ver más adelante). Por esta razón, es de interés hacer en primer lugar un repaso a aquellos hallazgos más significativos, tanto ultraestructurales como electrofisiológicos, derivados de la obstrucción del flujo sanguíneo en la retina del mono y seguidamente continuar con el estudio de los efectos de la isquemia observados en otros animales y en especial en la rata adulta, que es el animal de experimentación utilizado.

1.4.1.- Isquemia retiniana en monos

Hayreh y Weingeistein (1980b) estudiaron con microscopía óptica y electrónica la retina de monos ardilla, cuando se bloquea selectivamente el flujo sanguíneo de la arteria central de la retina, mediante su disección y clampaje a nivel retrobulbar. Este estudio, un clásico en el terreno de la isquemia retiniana, documentó que la isquemia mantenida durante 98 minutos no producía daño neuronal significativo, pero cuando el tiempo de isquemia era de 105 minutos o más se producía un daño neuronal irreversible en las capas más internas de la retina. En efecto, estos autores observaron que los fotorreceptores y el tercio externo de la capa nuclear interna aparecían morfológicamente normales tras 105 minutos de isquemia y sólo se afectaron morfológicamente las capas más internas. Estos autores también observaron una diferente susceptibilidad de las diversas áreas retinianas a la isquemia, siendo la región macular más susceptible, y disminuyendo la susceptibilidad desde la región perimacular a la periferia retiniana. Esta observación no ha sido aislada, y ha sido corroborada en este mismo animal de experimentación por Hughes (1991). Además se observó en este trabajo que las diferentes células retinianas poseen una diferente susceptibilidad a la isquemia. Así, las CGR fueron las células más sensibles a la isquemia; mientras la astrogliya y las de Müller fueron las menos susceptibles (Hayreh y Weingeistein, 1980b).

Kroll (1968) estudió los efectos de este tipo de isquemia retiniana selectiva sobre la retina del mono por medio de microscopía electrónica y postuló que la resistencia a la isquemia de las células de Müller podría venir dada por tres factores: i) Porque su citoplasma rodea completamente a los capilares y, por tanto, son las primeros en acceder a los nutrientes que quedan en su luz, cuando la arteria central de la retina es ligada; ii) Porque son unas células que se extienden por todo el espesor de la retina, desde la membrana limitante interna hasta el segmento interno de los fotorreceptores, lo que hace que su porción más

externa no se afecte por la oclusión de la arteria central de la retina ya que recoge nutrientes de la coriocapilar; y iii) Porque el citoplasma de la célula de Müller es rico en enzimas necesarios para la glicolisis anaerobia (Cogan y Kuwabara, 1959) por lo que podría tolerar mejor la falta de oxígeno.

Aunque los estudios ultraestructurales de la retina tras la isquemia pueden ofrecer una información acertada del grado de tolerancia de este tejido a la isquemia, otra fuente de datos no menos importante, que refleja la sensibilidad de la retina a la falta de riego sanguíneo son los estudios que utilizan pruebas electrofisiológicas, ya que nos informan sobre el estado funcional de la retina. Las pruebas electrofisiológicas utilizadas para evaluar el estado funcional de la retina tras la isquemia retiniana han sido el electroretinograma (ERG) y los potenciales visuales evocados (PVE). El ERG nos informa de la actividad eléctrica de la retina, mientras que los PVE son considerados como un reflejo funcional de la vía visual en su totalidad (Méndez y Demicheli, 1992).

Fueron también Hayreh y Weingeistein (1980b) los que utilizaron el (ERG) y los (PVE) durante la isquemia selectiva mantenida por OACR en monos ardillas. Los hallazgos de este estudio fueron que el ERG puede recuperarse incluso tras períodos de isquemia-reperfusión de hasta 135 minutos. Los resultados obtenidos en este estudio utilizando los potenciales visuales evocados, muestran una estrecha correlación con los hallazgos histológicos obtenidos y que hemos reseñado anteriormente, ya que no se recuperaron cuando la isquemia superó los 105 minutos. Estos datos son similares a los ya obtenidos por otros autores (Fujino y Hamasaki, 1965; Hamasaki y Kroll, 1968), en trabajos realizados también en monos, que documentaron que entre 6 y 15 minutos de isquemia se producía una disminución de la respuesta del ERG y que ésta quedaba abolida completamente a los 90 segundos, pero que esta respuesta se recuperaba si la perfusión retiniana ocurría antes de pasadas 2 - 3,5 horas. Sin

embargo, éstos son resultados más cualitativos que cuantitativos y además no dan información del estado de la capa de CGR, aunque se ha observado que para que la onda b del ERG no se altere se requiere que la circulación retiniana y coroidea estén intactas (Fujino y Hamasaki, 1965).

En este apartado sobre la isquemia retiniana nos gustaría mencionar por último un estudio realizado por Sipperley y cols. (1973) realizado con el fin de conocer, en humanos, la relación de la onda b del ERG con los niveles de presión intraocular. Para ello en voluntarios humanos, se estudió el ERG tras incrementar la presión intraocular hasta niveles iguales o superiores a la presión sanguínea diastólica de la arteria oftálmica. El incremento de la presión intraocular se realizaba mediante una copa de succión que producía una deformación externa del globo ocular, y sus valores se conocían a través de un oftalmodinamómetro. En este estudio se observó que la onda b del ERG se reducía cuando la presión intraocular superaba la presión diastólica de la arteria oftálmica, pero no quedaba totalmente abolida hasta que transcurrían al menos 5 minutos más, es decir, se producía una alteración de la onda b del ERG cuando los niveles de presión intraocular se aproximaban o excedían la presión arterial diastólica de la arteria oftálmica.

1.4.2. Isquemia retinianas en otros animales de experimentación

La inducción de isquemia retiniana mediante técnicas selectivas que bloqueen el paso sanguíneo exclusivamente en la arteria central de la retina sólo ha sido descrita en el mono. En otros animales de experimentación se han utilizado técnicas de inducción de isquemia transitoria de la retina en las que se produce un bloqueo generalizado de la circulación retiniana y coroidea provocando lesión en la totalidad del espesor retiniano. Las dos técnicas más utilizadas por diversos autores para obtener información sobre los efectos histológicos o funcionales derivados de la isquemia-reperfusión de la retina, son

bien el incremento de la presión intraocular o bien la ligadura a nivel retrobulbar del nervio óptico junto con los vasos retinianos.

Stefánson y cols. (1988), tras producir una isquemia-reperfusión de la retina ligando el nervio óptico en ratas, observaron una repuesta proliferativa, manifestada como figuras mitóticas en las células de la capa nuclear interna sometidas a una hora ó más tiempo de isquemia, con una respuesta máxima entre las 48 y 96 horas tras reperfundir la retina. Otros autores (Reinecke y cols., 1962; Faberowski y cols., 1989) encontraron proliferación de las células endoteliales vasculares, y (Kaga y cols., 1982) mitosis en células amacrinas, células endoteliales y pericitos secundarios a la isquemia observada en la retinopatía por talco sugiriendo que este estímulo proliferativo sea uno de los escalones iniciales en el desarrollo de un proceso de neovascularización y de formación de gliosis, actuando la isquemia como factor desencadenante. Estos hallazgos aunque importantes, han surgido secundariamente a la observación de las alteraciones morfológicas orientadas a determinar el umbral de daño celular irreversible en la retina sometida a fenómenos de isquemia-reperfusión.

El estudio del espesor de las capas de la retina y el recuento de la densidad lineal de células obtenidas en las secciones de retina son los métodos utilizados más frecuentemente para estudiar morfológicamente las secuelas de la isquemia retiniana (Reinecke, 1962; Huges, 1991; Büchi, 1992a; Buchi, 1992b). Otros autores (Faberowski y cols., 1989), han evaluado los efectos de la isquemia en base al número de núcleos picnóticos presentes en la capa nuclear interna. El estudio del comportamiento de la capa de CGR ante fenómenos de isquemia-reperfusión, se ha realizado siempre mediante el recuento lineal de las células en la capa de las CGR en secciones transversales de la retina. Esta capa de la retina formada por las células ganglionares contiene además un número de células amacrinas que llegan a constituir el 50% de la población celular de esta capa en

la rata adulta (Perry, 1981) hecho que dificulta la valoración selectiva de las repercusiones de la isquemia sobre las CGR, al no poder distinguirse ambos tipos celulares mediante técnicas histológicas convencionales.

Todos los autores que han estudiado las repercusiones histológicas que provoca la isquemia en el tejido retiniano en la rata adulta (Huges, 1991; Büchi y cols., 1991., Büchi, 1992a; Büchi, 1992b; Faberowski y cols., 1989), coinciden en señalar que: i) Periodos de isquemia de 30 minutos no provocan alteraciones morfológicas significativas; ii) Tiempos de isquemia iguales o superiores a 60 minutos producen una reducción del espesor normal de la retina, sobre todo a expensas de la retina interna; y iii) Cuando el tiempo de isquemia es igual o superior a 90 minutos, se produce la desaparición de la mayoría de las neuronas de la capa nuclear interna y de las CGR. Todos los autores señalan también que tras tiempos de isquemia iguales o superiores a 120 minutos, la retina queda reducida a una cicatriz glial. Estudios realizados en conejos (Johnson y Foulds, 1978), encuentran sin embargo, que las capas externas son más vulnerables que las internas a la isquemia ocular. Ulrich y Reimann (1986), han sugerido que este hecho se debe a que la retina del conejo es de tipo merangiótico o mal vascularizada, es decir, una retina caracterizada por vasos sanguíneos en una parte limitada de la retina, confinados a una banda horizontal que coincide con el área de dispersión de las fibras nerviosas mielinizadas y que se extiende desde el disco óptico al ecuador (De Schaepdrijver y cols., 1989), frente a la del gato, rata o primates que es holangiótica o bien vascularizada.

Sin embargo, es difícil comparar los datos de estudios semicuantitativos realizados en la rata adulta puesto que cada autor estudia una serie de parámetros histológicos o utilizan tiempos de isquemia y de reperusión diferentes. Los tiempos de isquemia varían entre los 3 y 7 días (Büchi y cols., 1992) y los tiempos de reperusión entre 15 días (Hughes, 1991) o entre 24 horas y 45 días

(Reinecke y cols., 1961) o entre 2 y 4 días (Stefánson y cols., 1988). Algunos de estos autores emplean además, como ya hemos mencionado, distintas técnicas para obtener la isquemia de la retina, lo que realizan bien mediante ligadura del nervio óptico (Stefánson y cols., 1988), o por incremento de la presión intraocular (Büchi y cols., 1992, Hughes, 1991; Reinecke y cols., 1961), por ello la comparación de resultados entre los diferentes autores debe de hacerse con cautela. De hecho, en estudios preliminares que inducen la isquemia transitoria de la retina incrementando la presión intraocular una de las cuestiones todavía sin resolver es si la presión intraocular puede ejercer daño por si misma, por efecto de compresión sobre las CGR y fibras nerviosas añadiéndose a la lesión provocada por la isquemia.

Es evidente que un incremento en la presión intraocular mantenido en el tiempo genera una lesión en las CGR y fibras nerviosas, lo que se cree que puede ser la causa de la pérdida visual en el glaucoma (Phelps, 1983). Lo que no se conoce es si una elevación brusca, aunque transitoria en el tiempo, de la presión intraocular es capaz de lesionar la retina. Anderson y Davis (1975), mantuvieron elevada la presión intraocular en monos durante 8 horas siempre por debajo de la presión arterial sistólica, es decir, sin llegar a producir una obstrucción completa de la arteria central de la retina y documentaron que este tipo de elevación de la presión intraocular producía una lesión de todas las capas de la retina.

En otros estudios se ha valorado la participación de los niveles de presión intraocular en la interrupción del flujo axonal (Hayreh y March, 1979), pero desafortunadamente los resultados de estos estudios no han llegado a ser concluyentes, aunque han sugerido que el bloqueo podía estar mediado por la propia isquemia. Quizás el no encontrar evidencia de que el incremento de presión intraocular a altos niveles, pero breve en el tiempo, tenga efecto lesivo



se deba a que sus consecuencias no sean inmediatas; sino que requiera para un periodo de tiempo desarrollarse y por tanto un estudio a más largo plazo de las retinas isquemiadas. Los estudios sobre la isquemia retiniana realizados a más largo plazo abarcan tan sólo 15 días de reperusión postisquemia (Hughes, 1991) y es por ello por lo que quizás no hayan evidenciado una lesión de la retina tras la isquemia.

1.4.3. Muerte celular postisquemia

Se ha estudiado también el tipo de muerte celular que se produce tras la isquemia retiniana. Büchi (1992a, 1992b) describió células necróticas y apoptóticas en las capas internas y externas de la retina tras periodos de isquemia-reperusión creados por elevación de la presión intraocular. Sin embargo, Kroll (1968), sólo observó un tipo de muerte celular, la necrosis, cuando la isquemia era producida por ligadura de la arteria central de la retina sin reperusión posterior. Quigley y cols. (1995) encontraron también un tipo de muerte apoptótico entre las células ganglionares de retinas sometidas a elevación crónica de la presión intraocular (24-72 mm Hg) durante varias semanas.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Para profundizar en el estudio de la muerte neuronal y de los posibles factores que intervienen o la desencadenan, proponemos estudiar qué efectos tiene la isquemia sobre las células ganglionares de la retina de la rata adulta. La muerte neuronal postisquemia ha sido estudiada en varias regiones del cerebro y se piensa que es debida entre otros factores, a la acción de ciertos aminoácidos excitotóxicos que se encuentran en condiciones normales en el sistema nervioso central en pequeñas cantidades pero que serían liberados masivamente durante la isquemia. La acción mantenida de estos aminoácidos excitotóxicos sobre las neuronas produciría la muerte de éstas, posiblemente por aumento excesivo de la entrada del calcio intracelular. Este tipo de muerte neuronal postisquemia en el cerebro parece aminorarse con la aplicación de diversas sustancias, cuyos mecanismos de actuación parecen ser diversos y aún no muy bien conocidos.

Aunque en la literatura se citan numerosos trabajos relacionados con el problema de la muerte de las células ganglionares de la retina desencadenada por

la isquemia (Büchi, 1992; Siliprandi y cols., 1988; Hughes, 1991; Szabo, y cols., 1991, Takahashi y cols., 1992; Louzada-Junior y cols., 1992; Siliprandi y cols., 1993), no existen estudios rigurosos cuantitativos que arrojen datos precisos sobre la relación que existe entre el tiempo de isquemia y la cuantía de la muerte neuronal provocada, ni sobre el umbral irreversible de daño celular causado por la isquemia. Tampoco existen estudios cuantitativos detallados que hayan caracterizado la relación que puede tener la muerte neuronal inducida por isquemia transitoria con el período de supervivencia o reperfusión. Por último, se desconoce también si los modelos utilizados para inducir isquemia experimental de la retina son capaces de desencadenar una lesión sobreañadida en las células ganglionares de la retina por efectos inherentes a la propia técnica.

Un estudio detallado de los efectos de periodos transitorios de isquemia de la retina a lo largo del tiempo, no solamente permitirá caracterizar la muerte neuronal que puede inducir la isquemia transitoria sino que sentará las bases de futuros estudios encaminados a determinar el efecto neuroprotector de diversas moléculas que pueden modular la supervivencia neuronal postisquemia (ver introducción y discusión).

En concreto nos planteamos los siguientes objetivos principales:

1) Desarrollar un método para inducir la isquemia transitoria de la retina por aumento de la presión intraocular que no invadiera estructuras intraoculares.

En este primer objetivo, de tipo técnico, se trataba de poner a punto un método que no implicara una punción intraocular, que fuera reproducible, medible y capaz de inducir isquemia total de la retina.

2) Desarrollar un método para marcar las CGR con un trazador fluorescente, el Fluorogold, y determinar su persistencia en estas células. Este segundo objetivo, también de tipo técnico, tenía por finalidad investigar si se podría

utilizar un trazador neuroanatómico moderno, el Flouorogold, para identificar la población de CGR a corto y largo plazo para realizar estudios cuantitativos de la supervivencia de las CGR.

3) *Investigar la respuesta de las CGR tras diferentes períodos de isquemia transitoria de la retina.* Se trataba de caracterizar la muerte de las GCR desencadenada por la isquemia, para ello nos propusimos determinar con técnicas cuantitativas como variaba la muerte de las CGR en función de la duración inicial de la isquemia transitoria. Se trataba también de determinar con exactitud el período de isquemia transitoria tras el cual se alcanza el umbral irreversible de daño celular y se produce muerte de las CGR.

4) *Determinar las características temporales de muerte de CGR inducido por isquemia transitoria.* Tratamos de averiguar si el intervalo de reperfusión o supervivencia que transcurre entre que se induce la isquemia y se procesa la retina, también influye en la supervivencia de las CGR. Es decir, cuál es el patrón de muerte a lo largo del tiempo.

Este cuarto objetivo de trabajo, se propuso a raíz de los resultados que se obtuvieron en el objetivo anterior sobre la tolerancia de las CGR ante diferentes períodos de isquemia transitoria. Quisimos investigar si la muerte provocada por este insulto estaba en función del tiempo de supervivencia del animal tras la fase de isquemia transitoria o si por el contrario todas las células afectadas morían en los primeros días después de la isquemia, como respuesta a una agresión severa pero limitada en el tiempo. Para ello compararíamos en diferentes grupos de animales, el número de CGR que sobreviven para un tiempo de isquemia determinado, pero analizando estos valores después de diferentes intervalos de supervivencia del animal, que oscilarían desde 5 a 30 días.

5) *Investigar el patrón de muerte de CGR inducido por la ligadura selectiva de la arteria oftálmica.* Los resultados de los experimentos realizados para el objetivo anterior indicaban que la muerte de CGR inducida por la isquemia ocurría en varias fases a lo largo del tiempo. Nos propusimos entonces explorar si las diferentes fases de muerte neuronal observadas en los experimentos anteriores se debían a la propia isquemia ó al aumento de presión intraocular en que se basaba la metodología empleada para producirla.

Este quinto objetivo quería esclarecer si la inducción de la isquemia de la retina mediante elevación de la presión intraocular por encima de la presión arterial sistólica podría provocar una lesión sobreañadida a la isquemia propiamente dicha, por un efecto mecánico o compresivo sobre los axones o somas de las CGR. A este fin, quisimos investigar si utilizando otro método de isquemia retiniana que consiste en ligar temporalmente los vasos retinianos sin lesionar el nervio óptico, induciría el mismo patrón de muerte de CGR.

MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. INTRODUCCIÓN

El principal objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de períodos de isquemia transitoria de diferente duración sobre la supervivencia de las células ganglionares de la retina (CGR) de la rata adulta. Así pues, los estudios de esta Tesis Doctoral se han basado en el análisis cuantitativo de la muerte neuronal inducida por diferentes tiempos de isquemia reversible o transitoria sobre las CGR. Además, nos interesó investigar de qué forma evolucionaba esta muerte celular provocada por la isquemia a lo largo del tiempo y para ello analizamos también el efecto de diferentes períodos de reperfusión o supervivencia postisquemia.

Dado que en la nomenclatura de los trabajos sobre la isquemia se utilizan diferentes términos, para evitar problemas de interpretación semántica, utilizaremos en este trabajo el término de **períodos de isquemia transitoria o reversible** para indicar el tiempo o periodo de isquemia al que sometemos la retina izquierda de la rata, y tras el cual se permite la revascularización de la

retina; y el término de **intervalo de reperfusión o supervivencia** para indicar el intervalo de tiempo que transcurre desde que finaliza la isquemia hasta que se procesa el animal, y que en nuestro estudio ha oscilado entre 5 y 30 días.

Para poder desarrollar este trabajo era fundamental disponer de un modelo experimental adecuado que nos permitiera estimar con fiabilidad la densidad de CGR presentes en las retinas de los animales experimentales. Con las técnicas histológicas convencionales no era posible distinguir las CGR de las células amacrinas desplazadas que suponen aproximadamente el 50% de las células que componen esta capa de la retina (Perry, 1981). Basándonos en un método de marcaje neuronal retrógrado previamente descrito (Vidal-Sanz y cols., 1988), que consiste en aplicar un trazador neuronal en el territorio de inervación de las CGR, hemos podido indentificar específicamente éstas células y distinguirlas de otras poblaciones celulares presentes en la capa de células ganglionares de la retina.

Una vez puesta a punto la metodología para marcar la población de CGR, procedimos a desarrollar el modelo de isquemia transitoria utilizado en nuestros experimentos. En este modelo, la isquemia transitoria y total de la retina se obtiene mediante el incremento de la presión intraocular producida por la deformación externa del globo ocular. Nuestro objetivo era inducir una isquemia total de la retina, que pudiera ser reversible, que perturbara lo menos posible las estructuras internas del ojo del animal, y que a la vez, nos permitiera un fácil control de la vascularización de la retina para asegurar la ausencia de flujo sanguíneo.

Por último, se realizó un grupo de experimentos en los que se indujo una isquemia retiniana mediante ligadura retrobulbar de la arteria oftálmica. La finalidad de utilizar esta otra técnica para lograr la isquemia de la retina, era

conocer si el grado de supervivencia de las CGR tras obstrucción del flujo sanguíneo es o no independiente de la técnica empleada para inducirla. Queremos dejar constancia que los resultados obtenidos con este grupo de experimentos son todavía preliminares, sin embargo, consideramos de interés incluirlos en esta tesis ya que ellos podrían contribuir a un mejor conocimiento de los mecanismos implicados en la lesión y muerte de las CGR.

Tras establecer estas técnicas, base de nuestro trabajo experimental, procedimos a diseñar y efectuar los diferentes grupos de animales de los que consta esta Tesis.

3.2. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN Y ANESTESIA

Todos los animales utilizados en nuestros experimentos se han tratado de acuerdo con las normas éticas internacionales dictadas por la Unión Europea en noviembre de 1986 (86/609/EV), con la legislación española para el uso de animales de laboratorio (BOE 67/8509-8512,1988) y con las Normas de la Asociación para la Investigación en Visión y Oftalmología (ARVO).

Hemos utilizado ratas hembras tipo Sprague-Dawley, con un peso de 170-220 gramos, obtenidas del estabulario de la Universidad de Murcia. Todas las manipulaciones experimentales fueron realizadas bajo anestesia del animal con hidrato de cloral al 7% en agua destilada, inyectado via intraperitoneal. La dosis inicial utilizada fue de 0,42 mg/g de peso corporal, y dosis adicionales de 0.2 ml inyectadas 45 minutos después de la primera dosis sirvieron para mantener el efecto anestésico durante todo el tiempo que duraban las manipulaciones experimentales. Una vez finalizado el periodo de isquemia, los animales eran devueltos al estabulario, donde eran alimentados "ad libitum" y se les mantenía

con temperatura controlada y sometidos a ciclos de luz-oscuridad de 12 horas. La intensidad de la luz variaba en un rango de 8 a 24 luxes.

3.3. MARCAJE RETRÓGRADO DE LAS CÉLULAS GANGLIONARES

Uno de los problemas que nos encontramos cuando estudiamos la capa de las células ganglionares de la retina de la rata adulta es distinguir las diferentes poblaciones celulares que la componen. Aproximadamente el 50% de las células que constituyen esta capa son células ganglionares y otro 50% son células amacrinas desplazadas (Perry, 1981). Dado que en este trabajo nos interesaba determinar el número de CGR que sobreviven tras someterlas a una agresión isquémica de diferente intensidad, era necesario utilizar un método que nos permitiera distinguir las CGR del resto de las células de esta capa de la retina.

Los principales territorios de proyección axonal en el sistema nervioso central (SNC) de las CGR en la rata son los colículos superiores (CS) y núcleos geniculados dorsolaterales (NGDL) (Linden y Perry, 1983; Martin 1986). Aplicando a estos territorios un trazador neuronal, éste es captado por las terminales axonales de las CGR y transportado retrógradamente hasta el soma celular, donde su acúmulo permite identificar estas células fácilmente y diferenciarlas de otras células presentes en la capa interna de la retina. En nuestro estudio hemos utilizado el marcador fluorescente Fluoro-gold (FG) (Schumed y Fallon, 1986; del Cerro y cols., 1989).

3.3.1. Técnica

Después de anestesiarse al animal, afeitarse y retirarse el pelo que recubre la parte dorsal de la cabeza y cuello, realizamos una incisión sagital en piel con



bisturí, exponiendo el cráneo del animal. Realizamos una craneotomía parietal bilateral con una fresadora (Dremel, Free-Wheeler, Cordless Moto-Tool, Model 850), y resecaamos con ayuda de una micropipeta conectada a un sistema de aspirado (Ordisi S.A., L'Hospitalet. Barcelona, España) la porción de encéfalo e hipocampo necesaria hasta exponer bilateralmente la parte posterior del tálamo y ambos colículos superiores. (Fig.1) Retiramos entonces cuidadosamente la piamadre que recubre al CS y aplicamos sobre toda la superficie de ambos lados del CS y nGDL, un pequeño trozo de esponja (Spongostan Film, Ferrosan, Demark) empapada en Fluoro-gold (FG) (Fluorochrome, Inc., Engelwood, Colorado, USA) diluido al 3% en cloruro sódico al 0,9% conteniendo un 10% de dimetilsulfóxido. Por último, cubrimos la craneotomía con Spongostan y suturamos la piel del animal con seda de 3/0.

3.3.2. Estudio del tiempo necesario para obtener el marcaje de las CGR.

Para determinar cuál era el periodo de tiempo óptimo necesario para que el trazador neuronal fluorescente (FG), una vez aplicado en el SNC, llegue hasta el soma de las CGR, quedando marcada esta población celular en su totalidad, hemos realizado una serie de experimentos preliminares en los que se marcaron 6 animales con FG en CS y NGDL mediante la técnica previamente descrita. Dos animales se procesaron a los cuatro días del marcaje, dos a los 7 días y dos a los 10 días, estimándose la densidad de CGR por milímetro cuadrado en cada una de sus retinas.

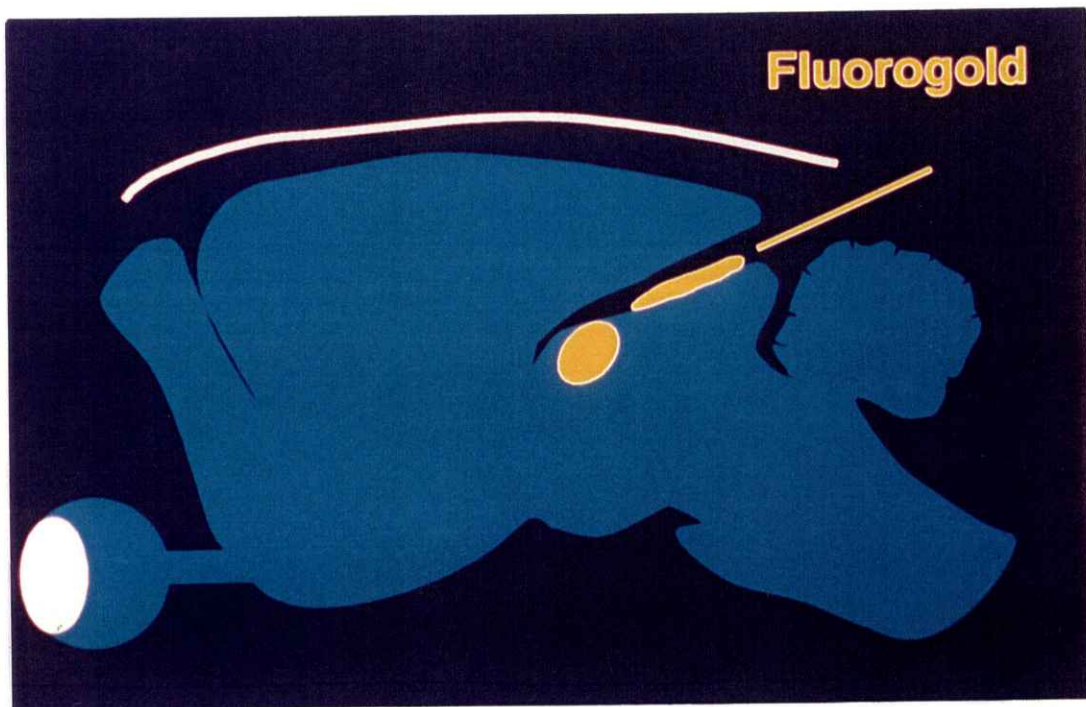


Fig. 1. Representación esquemática de los principales territorios de proyección de los axones de las CGR en el cerebro, colículo superior (CS) y núcleo geniculado dorsolateral (NGDL). Tras la aplicación en dichas áreas del trazador neuronal fluorescente, fluorogold (FG), por transporte axonal retrógrado llegará hasta el soma de las CGR, lo que permitirá la identificación de estas células.

El análisis de estos experimentos preliminares indicó que siete días después de aplicar el FG en el SNC era un intervalo de tiempo suficiente para producir un marcaje óptimo de la población de CGR. Por ello en lo sucesivo se adoptó 7 días como el intervalo estándar necesario para el marcaje de la población de CGR de la retina.

3.3.3. Estudio de la permanencia del FG en el soma celular a lo largo del tiempo.

Para estudiar la supervivencia de las CGR en los grupos de animales examinados tras largos períodos de tiempo después de la agresión isquémica, era importante determinar la persistencia del FG en el interior de la célula a lo largo del tiempo. Es decir, teníamos que investigar si el FG permanecía en el citoplasma de la célula independientemente del tiempo transcurrido desde su aplicación. Esta característica, la persistencia del trazador neuronal retrógrado varía con los diferentes trazadores y puede oscilar entre 48 horas para la peroxidasa de rábano o el azul rápido y 21 meses como ocurre con el trazador neuronal lipofílico de la familia de las carbocianinas diI (perclorato de 1,1'-Dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametil indocarbocianina) (Vidal-Sanz y cols., 1988; Villegas-Pérez y cols., 1993).

Realizamos un estudio estadístico de las densidades de CGR marcadas con FG obtenidas en las retinas derechas o controles (contralaterales a las retinas isquemiadas) procesadas a los 5, 7, 14, 30 y 90 días de la isquemia transitoria. Teniendo en cuenta que el trazador es aplicado en CS y nGDL 7 días antes de la isquemia, los períodos de tiempo que se valoraron desde la aplicación del FG fueron 12, 14, 21, 37 y 97 días. El número de retinas analizadas para cada uno de estos períodos de tiempo fué el siguiente: 12 días (n = 26); 14 días (n = 28); 21 días (n = 42); 37 días (n = 41); 97 días (n = 22).

3.4. MODELO DE ISQUEMIA RETINIANA

Nos interesaba poner a punto un modelo o técnica de obtención de isquemia retiniana que alterara lo menos posible las estructuras oculares. Entre las diferentes técnicas descritas en la bibliografía para producir una isquemia transitoria de la retina en el ojo de la rata (ver introducción), la más utilizada por diferentes autores se basa en la obstrucción del flujo sanguíneo retiniano mediante incrementos de la presión intraocular. En el desarrollo del modelo utilizado para este trabajo conseguimos la interrupción del flujo sanguíneo retiniano evitando lesionar estructuras oculares internas, sin introducir sustancias extrañas en el interior del ojo y sin afectar directamente los axones de las células ganglionares. Para ello hemos inducido incrementos de la presión intraocular por encima de los valores de la presión arterial sistólica, por deformación del globo ocular.

3.4.1. Método de obtención de la isquemia retiniana.

Con el animal previamente anestesiado, instilamos una gota de anestésico tópico (Colircusí anestésico doble, Laboratorios Cusí, El Masnou, Barcelona) para evitar el reflejo del parpadeo durante la manipulación ocular. Seguidamente instilamos una gota de tropicamida (Laboratorios Cusí, El Masnou, Barcelona) con el fin de obtener una midriasis que nos permitiera en todo momento la observación del fondo de ojo del animal.

Para incrementar la presión intraocular, hemos utilizado una seda de 6/0 (Laboratorio Alcon) que pasamos a través de la mitad superior de la conjuntiva bulbar mediante varios puntos radiales que abarcan desde fondo de saco hasta el limbo del ojo del animal, dejando al inicio y al final de la zona suturada dos

cabos lo suficientemente largos para poder traccionar de los mismos. Realizamos la misma operación a través de la mitad inferior de la conjuntiva bulbar del mismo ojo (Fig.2). Traccionando suavemente de los dos cabos superiores y de los dos inferiores, en sentido opuesto, provocamos un incremento de la presión intraocular que produce la interrupción del paso de sangre por la arteria central de la retina cuando se superan los valores de presión arterial sistólica. Una vez conseguido el inicio de la isquemia retiniana dirigimos los cabos de los hilos hacia un sistema de sujección diseñado para tal fin, que consta de una pequeña bandeja donde se inmoviliza al animal y unos pivotes verticales próximos a su cabeza (aprox. 10 cm) que nos permitía fijar los cabos de las suturas y mantenerlas tensadas durante el periodo requerido.

Se instilaba sobre el ojo del animal una gota de Goniotal (Metilcelulosa al 10%, Laboratorios Cusí, El Masnou, Barcelona) y un pequeño cubreobjetos circular de 12 mm de diámetro, lo que permite a través del microscopio operatorio observar el fondo de ojo del animal y controlar el estado de la vascularización de la retina durante todo el período de isquemia experimental.

Una vez finalizado el período de isquemia, destensamos suavemente los hilos de sutura, observando como se reperfundió de nuevo todo el árbol vascular retiniano, mostrando una hiperemia reactiva postisquemia, también descrita por otros autores (Büchi, 1992b; Roth y Pietrzyk, 1994). Retiramos la sutura colocada a través de la conjuntiva y procedemos a la tarsorrafia o sutura del borde palpebral del animal con tres puntos sueltos (seda 6/0) para evitar la ulceración de la córnea por desecación y rascado postoperatorio, pues comprobamos que esto ocurría en ocasiones en los animales intervenidos. Los puntos de la tarsorrafia eran eliminados por acción del rascado del mismo animal y en ningún caso permanecían más de 48-72 horas.

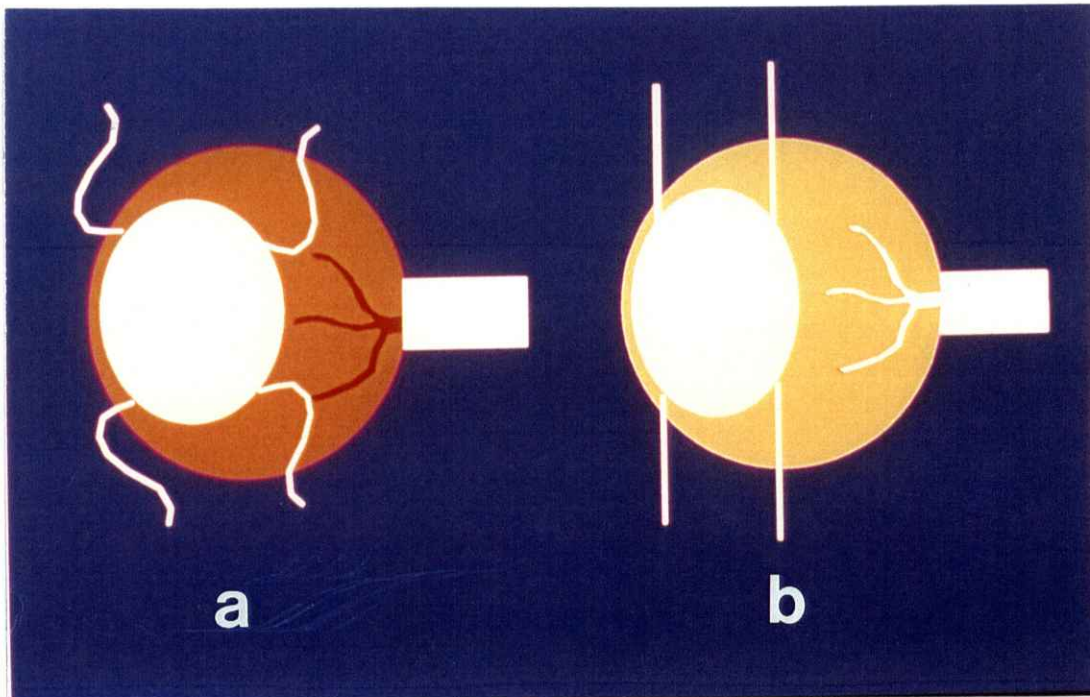


Fig. 2. Representación esquemática del método utilizado para inducir isquemia retiniana. Se sutura la mitad superior y mitad inferior de la conjuntiva bulbar del ojo del animal con sedas de 6/0 desde el limbo a fornix, como muestra la figura (a). Se tracciona suavemente de los hilos de sutura en sentido opuesto (b) hasta que se observa la detención del flujo sanguíneo en la arteria central de la retina.

La isquemia retiniana se realizó en todos los casos en el ojo izquierdo de cada animal, el ojo derecho no ha estado sujeto a manipulación experimental alguna, utilizándose en todos los casos como control.

3.4.2. Obstrucción de la circulación retiniana por incremento de la presión intraocular.

Para determinar el mecanismo por el cual se producía la interrupción del flujo sanguíneo retiniano cuando traccionábamos en sentido opuesto de los hilos de sutura anclados en la conjuntiva bulbar del animal, se realizaron unos experimentos preliminares en los que se monitorizó simultáneamente la presión intraocular y la presión arterial.

Para ello, se utilizaron 12 animales a los que se preparó según el método descrito arriba para realizar una isquemia retiniana y se les introdujo una aguja de 30G en la cavidad vítrea a través de la esclera a un milímetro por detrás del limbo esclerocorneal y conectada a un transductor de presión. Simultáneamente se midió la presión arterial sistólica en el mismo animal, introduciendo una cánula en la arteria femoral conectada igualmente a un transductor de presión.

La tracción controlada y progresiva, en sentido opuesto, de los hilos de sutura anclados en la conjuntiva bulbar, provocaba incrementos crecientes de la presión intraocular que quedaban registrados junto con los correspondientes a la presión arterial sistólica y diastólica de cada animal sobre un papel milimetrado. De esta manera comprobamos los valores de presión intraocular para los cuales quedaba detenido el flujo sanguíneo en los vasos retinianos, y su relación con los valores de presión arterial del animal en cada momento.

La aguja utilizada para registrar la presión intraocular quedaba en ocasiones obstruida al contactar su punta con el cristalino, en estos casos con un suave movimiento de la misma obteníamos de nuevo registros adecuados. Si el cristalino quedaba dañado podía alterar su transparencia, con pérdida de visibilidad del fondo de ojo del animal, esto era razón para excluirlo del estudio. La cánula insertada en la arteria femoral a través de la cual se registraba la presión arterial debía lavarse periódicamente con solución salina heparinizada para evitar que se obstruyera.

3.4.3. Estudio del grado de interrupción del flujo sanguíneo ocular.

Una vez establecida la técnica de obtención de la isquemia retiniana nos interesaba estudiar si el incremento de la presión intraocular por encima de los valores de presión arterial sistólica inducía además de la interrupción del flujo de la arteria central de la retina, una interrupción de la circulación coroidea de la que dependen las capas más externas de la retina.

Dado que los animales de experimentación utilizados en este estudio, ratas Sprague-Dawley, son albinas, la ausencia de melanina nos permitía ver a través de la retina y por transparencia los vasos coroideos y la red vascular del iris, lo cual nos permitía observar la circulación coroidea y retiniana, que se interrumpían cuando traccionábamos de las suturas ancladas a la conjuntiva. No obstante para documentar la interrupción de la totalidad del flujo sanguíneo ocular producido con la técnica desarrollada, se realizó el experimento que se describe a continuación.

Utilizamos dos animales, a los que se preparó para producirles una isquemia retiniana por el método previamente descrito. Una vez establecida la

isquemia mantuvimos la tracción de los hilos de sutura mientras se procedió al sacrificio del animal inyectando una dosis letal de anestésico. Perfundimos seguidamente al animal con suero salino al 0,9% a través de la aorta ascendente, continuando la perfusión con un preparado de paraformaldehído al 10% y tinta china en proporción 1:10, según el método descrito previamente por Duvernoy (según ref. Triviño Casado y cols, 1980).

Tras enuclear ambos ojos se mantuvieron inmersos una hora en paraformaldehído al 4% y seguidamente en sucrosa al 30%, y se procedió a su congelación para obtener secciones sagitales de ambos ojos de 30 micras de espesor en el criostato. Las secciones se tiñeron con violeta de cresilo y se observaron al microscopio óptico.

3.5. GRUPOS EXPERIMENTALES DE ISQUEMIA RETINIANA

Para investigar el efecto de la isquemia transitoria en la supervivencia de las CGR diseñamos un primer grupo de experimentos (Grupo A), en los que se indujeron períodos diferentes de isquemia transitoria que oscilaron entre 30 y 120 minutos y que se analizaron a los 30 días de la isquemia.

Los resultados de este primer grupo de experimentos analizados a los 30 días de la isquemia nos indujeron a realizar grupos adicionales (Grupos B, C, D y E) que se examinaron en intervalos de tiempo de 5, 7, 14 y 90 días respectivamente, tras la isquemia, para determinar el efecto del intervalo de supervivencia o reperfusión en la supervivencia de las CGR.

Así pues, según el período e supervivencia tras la isquemia transitoria, los animales se clasificaron en: **i) Grupo A:** animales con periodo de supervivencia

de de 30 días postisquemia. ii) Grupo B: animales con un período de supervivencia de 14 días postisquemia. iii) Grupo C: animales con un período de supervivencia postisquemia de 7 días. iv) Grupo D: animales con un período de supervivencia de 5 días tras la isquemia. v) Grupo E: animales sometidos a un período de supervivencia de 90 días postisquemia.

Dentro de cada grupo experimental A, B, C, D y E, se consideraron varios subgrupos de animales, cada subgrupo fue sometido a 30, 45, 60, 75, 90, 105 y 120 minutos de isquemia transitoria. En el grupo D, no se realizaron isquemias de 105 minutos. Los grupos estudiados y número de animales utilizados se describen en la tabla 1.

3.6. PROCESO DE LAS RETINAS

Para el sacrificio del animal se utilizaron dosis letales de hidrato de cloral al 7% por vía intraperitoneal. Una vez comprobado que eran insensibles a estímulos dolorosos, los animales se perfundieron a través de aorta ascendente con suero salino al 0,9% para lavar el contenido hemático de los vasos, continuando la perfusión con paraformaldehído al 4% en tampón fosfato 0,1 M a 4°C de temperatura para obtener la fijación de los tejidos.

3.6.1. Manejo del globo ocular y preparación de las retinas

Tras la perfusión, se procedió a enuclear los globos oculares, y previamente se anudó un hilo de sutura en el polo superior de cada ojo que nos permitiera identificar la región superior de la retina. Además siempre se

diferenciaron el ojo derecho del izquierdo ya que suturamos un hilo más corto para los ojos derechos y más largo para los izquierdos. Tras la enucleación, realizamos la apertura del globo ocular, seccionando a nivel del limbo esclerocorneal y retirando todas las estructuras del polo anterior del ojo: Córnea, iris y cristalino. Nos quedábamos con la parte posterior del globo ocular en forma de semiesfera o copa. Entonces realizamos cuatro cortes radiales equidistantes dirigidos hacia el nervio óptico, de manera que el corte correspondiente al polo superior, señalado previamente con el hilo de sutura, fuera el más profundo para poder reconocer los cuadrantes retinianos (divididos de esta forma en temporal superior, temporal inferior, nasal superior y nasal inferior). A continuación separábamos completamente la retina de la coroides y la esclera, colocamos la retina a plano sobre un papel de filtro y la postfirmos en paraformaldehído al 4% durante una hora. Posteriormente lavamos la retina en solución salina/tampón fosfato 0,1 M (PBS) durante otra hora y la montamos con la cara interna hacia arriba en un portaobjetos gelatinizado, con unas gotas sobre ella de una solución de glicerol al 50% en tampón carbonato sódico 0,1M, pH 9, conteniendo un 0,04% de p-feniléndiamina, cubriéndolas con un cubreobjetos. Se sellaron los bordes del cubreobjetos con laca de uñas, procediéndose a continuación a su examen al microscopio de fluorescencia.

3.6.2. Estimación de la densidad de CGR por mm²

Las retinas se observaron y fotografiaron en un microscopio Zeiss (Axiophot) equipado con sistema de epifluorescencia, utilizando un filtro ultravioleta (emisión 365nm/12, supresión 397nm) que permite observar la fluorescencia del FG.

Para estimar las densidades de células ganglionares (CGR/mm²), tanto en las retinas experimentales como en las controles, se contabilizaron las células marcadas con FG en fotografías tomadas de doce áreas estandar de cada retina

(0,36 x 0,24 mm²), tres en cada cuadrante retiniano (Temporal superior, temporal inferior, nasal superior y nasal inferior), y situadas a 0,875, 1,925 y 2,975 milímetros respectivamente del disco óptico (Villegas-Pérez y cols., 1988). A partir del número de células obtenidas en estas fotografías estimamos la densidad media de las células ganglionares por milímetro cuadrado para cada una de las retinas (fig.3).

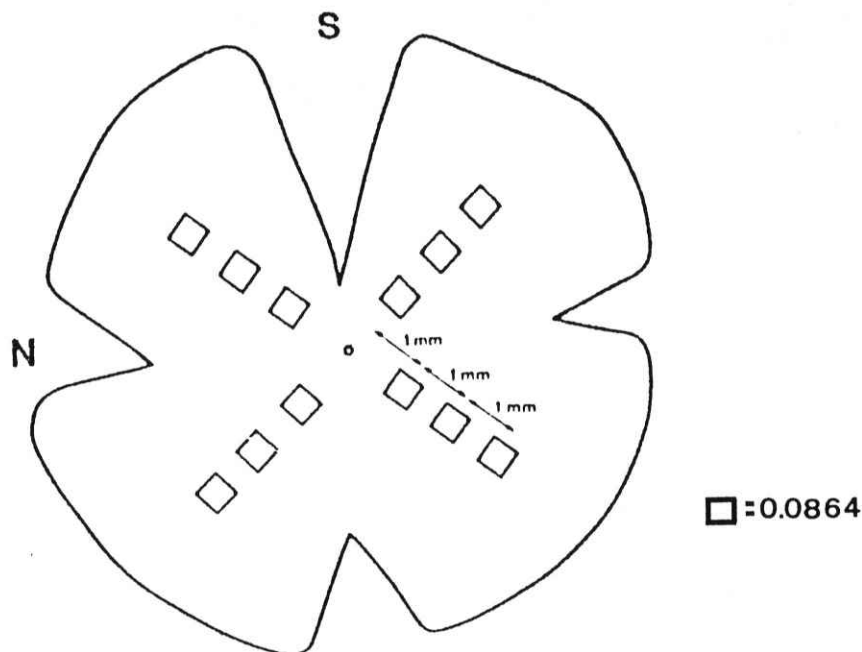


Fig. 3. Representación esquemática del montaje global o "in toto" de una retina izquierda en la que se ilustra el método que se utiliza para la toma de fotografías de la capa de células ganglionares de la retina (tomado de Villegas-Pérez, 1986). Se realizan tres fotografías en cada uno de los cuadrantes retinianos, a aproximadamente 1, 2 y 3 mm (0,875, 1,925 y 2,975 mm) respectivamente desde el nervio óptico. El tamaño de superficie retiniana que recoge cada fotografía es de 0,0864 como muestra el cuadrado inferior de la figura. (N: nasal; S: superior)

3.7. ISQUEMIA INDUCIDA POR LA LIGADURA SELECTIVA DE LA ARTERIA OFTÁLMICA

Para determinar si el aumento de presión intraocular por encima de valores sistólicos, pudiera tener algún efecto lesivo adicional a la isquemia, como por ejemplo la lesión directa de los axones de las CGR, efectuamos un grupo adicional de experimentos: Grupo F de 11 ratas. Este grupo de animales se realizó una vez analizados los datos de los grupos experimentales antes mencionados.

En este grupo de animales, se indujo una isquemia transitoria de la retina mediante el abordaje, disección cuidadosa y ligadura selectiva de la arteria y vena central de la retina sin lesionar el nervio óptico. Este método de inducción de isquemia se diferencia del que hemos utilizado en los experimentos anteriores en que no se precisa incrementar la presión intraocular y es similar en cuanto a que induce una isquemia total de la retina, que puede ser reversible, es decir transitoria, y que permite también un fácil control peroperatorio de la vascularización retiniana.

La metodología empleada para el grupo F de animales fue similar a la empleada en los grupos anteriores con la siguientes salvedades.

En 11 ratas, a las que siete días antes se había aplicado FG en ambos CS y NGDL se procedió a disecar y ligar la arteria y vena oftálmicas. Previamente anestesiadas y heparinizadas, se realizaba una incisión en el reborde orbitario superior del globo ocular izquierdo, y tras disecar el tejido adiposo y glandular

que cubre el globo ocular se disecaba y seccionaba el músculo recto superior. Esto permitía acceder al aspecto superior y externo del nervio óptico, en su trayecto intraorbitario y porción más proximal al globo ocular. La cubierta dural que cubre el nervio óptico se abría longitudinalmente y se separaba de él cuidadosamente, sin lesionar el haz de fibras nerviosas. Una vez aislada la cubierta dural se pasaba una ligadura de nylon de 8/0 y se anudaba para obstruir la circulación arterial y venosa de la retina. La cubierta dural del nervio óptico contiene en su espesor, en el aspecto inferior y nasal, la arteria oftálmica y el sistema venoso ocular en su trayecto intraorbitario inmediatamente anterior a penetrar la esclera. Transcurrido un período de isquemia transitoria de 90 minutos se procedía, cuidadosamente, a retirar la ligadura alrededor del paquete vascular oftálmico sin lesionar el nervio óptico.

La observación del fondo de ojo a través del microscopio permitía comprobar la detención del flujo sanguíneo intraretiniano y su reinstauración al poner y retirar, respectivamente, la ligadura. La reinstauración del flujo sanguíneo ocurría con frecuencia de manera espontánea en los primeros minutos tras retirar la ligadura, en ocasiones un suave masaje ocular facilitaba la reinstauración del mismo. En aquellas ocasiones en las que el flujo sanguíneo intraretiniano no se recuperaba en el transcurso de los primeros 5 minutos se excluía el animal del estudio. Retirada la sutura se procedía a reconstruir la herida orbitaria y a realizar una tarsorrafia.

Para comprobar que la ligadura de la arteria y vena oftálmica en su porción inmediatamente anterior a su entrada en la esclera, inducía una isquemia total de la retina, es decir, un bloqueo de la circulación intraretiniana y coroidea, en 2 animales adicionales, una vez ligado el paquete vascular oftálmico, se procedió a la perfusión transaórtica con paraformaldehído al 10% y tinta china

en proporción 1:10 según se describe anteriormente, para analizar al microscopio óptico la vascularización de estas retinas.

Para comparar los efectos de este tipo de isquemia vascular con la obtenida tras el aumento de la presión intraocular, se analizaron 7 y 4 animales, a los 7 y 30 días, después respectivamente, de inducir una isquemia transitoria de 90 minutos (Tabla 1).

3.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para analizar la permanencia del FG en el citoplasma de las CGR de las retinas control a lo largo del tiempo, se han valorado las densidades (CGR/mm²) de todas las retinas derechas de los animales sometidos a 5, 7, 14, 30 y 90 días de supervivencia tras la isquemia experimental utilizando la t de Student. Estos datos se analizaron también con modelos lineales matemáticos que trataron de correlacionar la persistencia del FG en las CGR en función del tiempo.

Para el análisis estadístico de los datos obtenidos en los grupos experimentales para cada tiempo de isquemia y para cada tiempo de supervivencia del animal, se compararon usando el test no paramétrico ANOVA de una vía, Kruskal Wallis, seguido del test de Mann-Whitney para comparaciones entre grupos.

Intervalo de supervivencia postisquemia		Tiempo de isquemia / nº de animales						
		30'	45'	60'	75'	90'	105'	120'
Grupo A	5 días	3	3	6	5	5	--	4
Grupo B	7 días	4	4	4	4	5	4	4
Grupo C	14 días	8	4	8	6	5	4	6
Grupo D	30 días	7	6	7	5	5	5	6
Grupo E	90 días	4	4	4	3	4	--	3
Grupo F	7 días					7		
	14 días					4		

Tabla (1): Número de animales en cada grupo experimental

RESULTADOS

4.- RESULTADOS

- 1.- Incrementos de la presión intraocular que producen una interrupción del flujo sanguíneo de la retina.
- 2.- Utilidad del Fluoro-gold (FG) como marcador persistente de las CGR.
- 3.- Supervivencia de las CGR tras diferentes períodos de isquemia transitoria de la retina.
- 4.- Supervivencia de las CGR tras diversos intervalos de reperfusión.
- 5.- Supervivencia de las CGR tras ligadura selectiva de la arteria oftálmica.

4.1. INCREMENTOS DE LA PRESIÓN INTRAOCULAR QUE PRODUCEN UNA INTERRUPCIÓN DEL FLUJO SANGUÍNEO DE LA RETINA.

En la puesta a punto del método que íbamos a utilizar era importante determinar: 1) Si la deformación del globo ocular que provocábamos mediante la tracción conjuntival inducía un incremento de la presión intraocular que a la vez interrumpía el flujo sanguíneo retiniano, y; 2) Si con este método el incremento de la presión intraocular mediante tracción conjuntival producía tanto obstrucción de la arteria central de la retina como del plexo coroideo, y por consiguiente una isquemia total de la retina.

4.1.1. Incremento de la presión intraocular como factor desencadenante de la detención del flujo sanguíneo retiniano

El registro simultáneo de los niveles de presión intraocular y de la presión arterial sistólica, mediante transductores de presión conectados a cámara anterior del ojo del animal y al torrente sanguíneo arterial, mostró que la tracción controlada y progresiva, en sentido opuesto, de los hilos de seda suturados a la conjuntiva bulbar, provocaba incrementos crecientes de la presión intraocular. La observación del fondo de ojo del animal a través del microscopio operatorio nos permitió valorar la arteria central de la retina a su salida por la cabeza del nervio óptico.

En los registros efectuados en los 12 animales, observamos que en condiciones basales, la rata presentaba una presión arterial sistólica que oscilaba

entre 110-120 mm Hg. que concuerda con estudios previos (Bianchi y Ferari, 1983), y unos valores de presión intraocular de 10-15 mm Hg. Cuando los valores de presión intraocular superaban los valores de presión arterial diastólica se observaba claramente el latido de la arteria central de la retina, y cuando la presión intraocular superaba la presión arterial sistólica (110-120 mm Hg) se producía la interrupción del flujo sanguíneo a su través, observándose un fondo pálido y anémico hasta que se permitía la restauración de la circulación (reperfusión) al disminuir la tracción conjuntival y con ello los niveles de presión intraocular. Esta observación fue muy consistente en todas las mediciones efectuadas a cada uno de los 12 animales, a los cuales se les repitió 4 ó 5 veces el registro tensando y destensando sucesivamente las suturas conjuntivales, para comprobar la homogeneidad de los mismos (Fig. 4.).

Estos registros simultáneos de presión intraocular y presión arterial corroboran hallazgos previos (Johnson y Foulds, 1978) e indican que el incremento de la PIO por encima de valores sistólicos detiene el flujo sanguíneo retiniano.

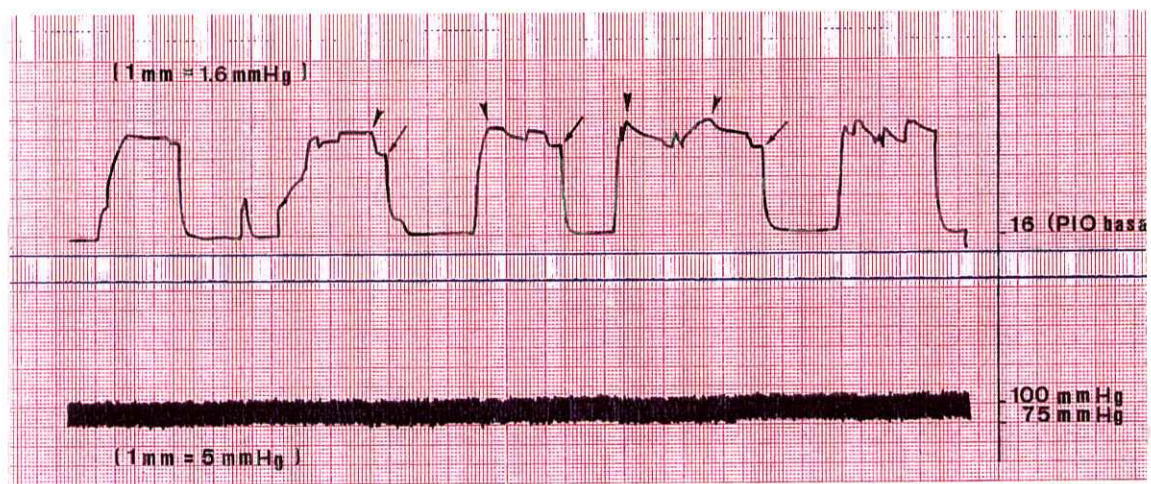


Fig. 4. Registro simultáneo de la presión intraocular (parte superior del registro) y de la presión arterial (parte inferior), en una rata en la que se indujo la isquemia de la retina por aumento de la presión intraocular, mediante tracción conjuntival. La vascularización de la retina se observaba directamente a través del microscopio operatorio. Los niveles de presión arterial sistólica y diastólica se mantuvieron constantes durante todo el registro. Los valores de presión intraocular basales (16 mm Hg) se incrementaban a medida que se traccionaba de los hilos de sutura. Cuando los valores de presión intraocular eran superiores a los diastólicos pero inferiores a los sistólicos (flechas), observábamos el latido de la arteria central de la retina. Si continuábamos incrementando la tracción de manera que la presión intraocular superaba la sistólica (puntas de flecha) se producía la detención del flujo sanguíneo retiniano.

4.1.2. Estudio del grado de interrupción del flujo sanguíneo retiniano.

Para documentar que la interrupción del flujo sanguíneo retiniano producido por aumento de la presión intraocular en nuestros experimentos, afectaba tanto al precedente la arteria central de la retina como al de los vasos coroideos, se analizó el árbol vascular en dos animales, mediante una técnica que permitía identificar la vascularización retiniana y coroidea.

Una vez establecida la isquemia retiniana mediante tracción conjuntival, se procedió a la perfusión del animal con un preparado conteniendo paraformaldehído al 10% y tinta china china en proporción 1:10, que impregna las paredes vasculares. Tras obtener secciones radiales de ambos globos oculares, se examinó a través del microscopio óptico la presencia o ausencia de tinta china en la red vascular retiniana y el lecho coroideo.

En el ojo derecho o control del animal apreciamos unas líneas de diferente grosor de color negro correspondientes a impregnación por la tinta china de la vascularización ocular, tanto en la coroides como en las capas más internas de la retina. En los cortes correspondientes al ojo izquierdo, sometido a presiones intraoculares superiores a la presión arterial sistólica mientras se realizó la perfusión con tinta china, no se observó marcaje alguno ni de los vasos retinianos ni coroideos, que nos sugiriera flujo sanguíneo en la retina. Por lo que podemos concluir que con este método de inducción de isquemia retiniana se produce una ausencia de irrigación en todo el ojo del animal, por el incremento de la presión intraocular transmitida a través de las paredes que forman el globo ocular.

4.2. UTILIDAD DEL FLUOROGOLD COMO MARCADOR PERSISTENTE DE LAS CGR.

Nos interesaba identificar selectivamente las CGR y distinguirlas de otras células presentes en esta capa de la retina. Para ello decidimos utilizar el trazador neuronal fluoro-gold (FG) como marcador de las CGR. Este trazador se aplicó en los principales territorios de proyección de las células ganglionares antes de practicar la isquemia transitoria de la retina. En un grupo de experimentos iniciales determinamos el intervalo de tiempo necesario entre la aplicación del FG y el marcaje óptimo de la población de CGR. Posteriormente determinamos la persistencia del FG en las CGR y por tanto su utilidad para realizar estudios a corto, medio y largo plazo de la supervivencia de CGR isquemiadas.

4.2.1. Tiempo requerido para obtener el marcaje de las CGR con FG.

En los experimentos realizados para determinar el tiempo óptimo que debía de transcurrir para que el trazador fluorescente marcara la totalidad de la población de CGR, analizamos las retinas de tres grupos de animales, procesados 4, 7 y 10 días después de aplicarles el FG en ambos CS y nGDL. En estos animales se estimó la densidad de CGR/mm² marcadas en las retinas de los animales procesados a los 7 y 10 días (Tabla.2), pero se desestimaron las analizadas a los 4 días por falta de homogeneidad en el marcaje de las CGR.

Una semana después de la aplicación del FG en los principales territorios retinorecipientes, observamos que la densidad de CGR es de 2660 ± 123 (Tabla 2), es similar a la obtenida utilizando otros trazadores neuronales fluorescentes aplicados en CS y NGDL como la carbocianina diI, 2436 ± 44 (Vidal-Sanz y cols., 1988) o el azul rápido aplicado en el CS, 2116 ± 94 (Vidal-Sanz y cols.,

1988) o en el nervio óptico, 2155 ± 167 (Villegas-Pérez y cols., 1988). Estos experimentos iniciales indicaban que 7 días era el mínimo intervalo de tiempo que debía de transcurrir para obtener un marcaje óptimo de la totalidad de la población de CGR.

CGR/mm2 marcadas con FG	7 días	10 días
	2416	2785
	2520	2685
	2729	2759
	2974	2590
n	4	4
media±ESM	2660±123	2705±44

Tabla (2): Número de CGR marcadas con Fluorogold, a los 7 y 10 días de su aplicación.

4.2.2. Densidades de CGR en las retinas de los ojos derechos o controles: Persistencia del FG.

El análisis a microscopía de fluorescencia de las retinas derechas o controles permitía observar las CGR marcadas con fluorogold. Estas células se identifican por la fluorescencia típica del FG en el citoplasma celular y segmentos iniciales de las dendritas primarias. No se apreciaron en estas retinas otros tipos celulares marcados con FG que no fueran CGR, al contrario de lo que sucedía en algunas de las retinas experimentales.

En los estudios iniciales de este trabajo la observación de las retinas controles de los animales sometidos a isquemia no nos sugería una disminución

o pérdida del número de células marcadas con FG. Sin embargo cuando estudiamos el grupo de animales sometidos a isquemia transitoria tras un intervalo de reperfusión de 3 meses, observamos que en las retinas controles aparecían marcadas un menor número de células ganglionares. En estas retinas control examinadas a los 90 días de isquemiar la retina contralateral o experimental, no se apreciaban detritus celulares, y de manera ocasional alguna célula microglial marcada con FG (Figs 5. 6 y 7).

Las densidades de CGR en retinas control (derecha, no isquemiada) disminuyeron a medida que el tiempo de supervivencia del animal excedía los 14 días. Cuando las densidades (CGR/mm²) de CGR marcadas con FG se agruparon según el tiempo de supervivencia tras la isquemia transitoria, sus medias \pm ESM (media \pm error estándar de la media) fueron: 2334 \pm 49, 2267 \pm 40, 2220 \pm 37, 1859 \pm 35, 1137 \pm 77 respectivamente, para los grupos de animales analizados a los 5, 7, 14 , 30 y 90 días respectivamente.

El análisis estadístico de las densidades de CGR en las retinas controles reveló una disminución en el número de células marcadas con FG, estadísticamente significativo, para periodos de tiempo que excedían las tres semanas tras la aplicación del trazador. El análisis estadístico entre las densidades obtenidas a los 5, 7, y 14 días no reveló diferencias significativas. Sin embargo se observaron reducciones significativas entre las densidades de CGR analizadas a los 14, 30 y 90 días de la isquemia transitoria del ojo contralateral (t-test, P< 0,0005). Treinta días después de la isquemia transitoria del ojo izquierdo, las densidades de CGR marcadas con FG en las retinas derechas habían disminuido aproximadamente un 16% con respecto a las retinas derechas

analizadas a los 14 días y a los 90 días de la isquemia la disminución era de aproximadamente un 49%.

Como la pérdida de FG en las CGR comienza a ser estadísticamente significativa a partir de 14 días de la isquemia transitoria, y la aplicación del trazador en los territorios de proyección de las CGR en el cerebro se realiza una semana antes, concluimos que el FG persiste el soma de las CGR por períodos de hasta 21 días tras su aplicación. Dado que a los 97 días de la aplicación del FG, el número de CGR es aproximadamente el 50% de la población inicial, el análisis de las retinas experimentales de este grupo no se ha considerado en este estudio por entender que la interpretación de los resultados se ve oscurecida y dificultada por este problema técnico del marcaje celular.

Los datos obtenidos se analizaron además para obtener un modelo de aproximación matemática al proceso de "pérdida del marcaje" de las CGR. Este modelo indica que la disminución de las CGR marcadas con FG en las retinas controles comienza a apreciarse a los 21 días de la aplicación y sigue un modelo de regresión lineal que permite predecir que el FG desaparecería de prácticamente la totalidad de la población de CGR a los 171 días.

El modelo de regresión lineal obtenido se ajustaría a esta ecuación:
 $y = 23633,01 - 13,8623 t$, donde y = número de células que se espera que estén marcadas con FG, y t = días transcurridos desde la isquemia de la retina experimental. El coeficiente de regresión $R^2 = 0,929$. Según esta ecuación el número de células esperables (y) para cada intervalo de supervivencia sería:

Si $t = 5$ días ($y = 2293,70$) Si $t = 7$ días ($y = 2265,97$);
Si $t = 14$ días ($y = 2168,14$) Si $t = 30$ días ($y = 1947,14$)
Si $t = 90$ días ($y = 1115,40$)

De acuerdo con los resultados del estudio sobre la persistencia del FG, para determinar si los diferentes intervalos de supervivencia tras isquemia a los que se ha sometido el animal, influyen en la muerte de CGR hemos comparado estadísticamente las densidades de CGR obtenidas a los 5, 7 y 14 días para cada período de isquemia.

En el grupo A (reperfusión de 30 días), para interpretar los resultados obtenidos hemos tenido en cuenta este proceso de desmarcaje o pérdida de FG. Además, y también basándonos en los resultados del estudio sobre la persistencia del FG, para cada grupo experimental se han comparado los valores obtenidos en las retinas isquemiadas con las controles de esos mismos animales, dado que para un mismo tiempo de supervivencia (p.ej. 30 días) el porcentaje de CGR desmarcadas será el mismo y por lo tanto comparable.

Las retinas experimentales del grupo E, analizadas a los 90 días tras la isquemia, no se ha considerado debido a que, como acabamos de mostrar, el FG no persiste en la CGR por largos períodos de tiempo y ello podría inducir a una interpretación errónea de los resultados. Las retinas derechas o controles de este grupo sí se han utilizado sin embargo, en el análisis de las propiedades del FG como trazador neuronal fluorescente.

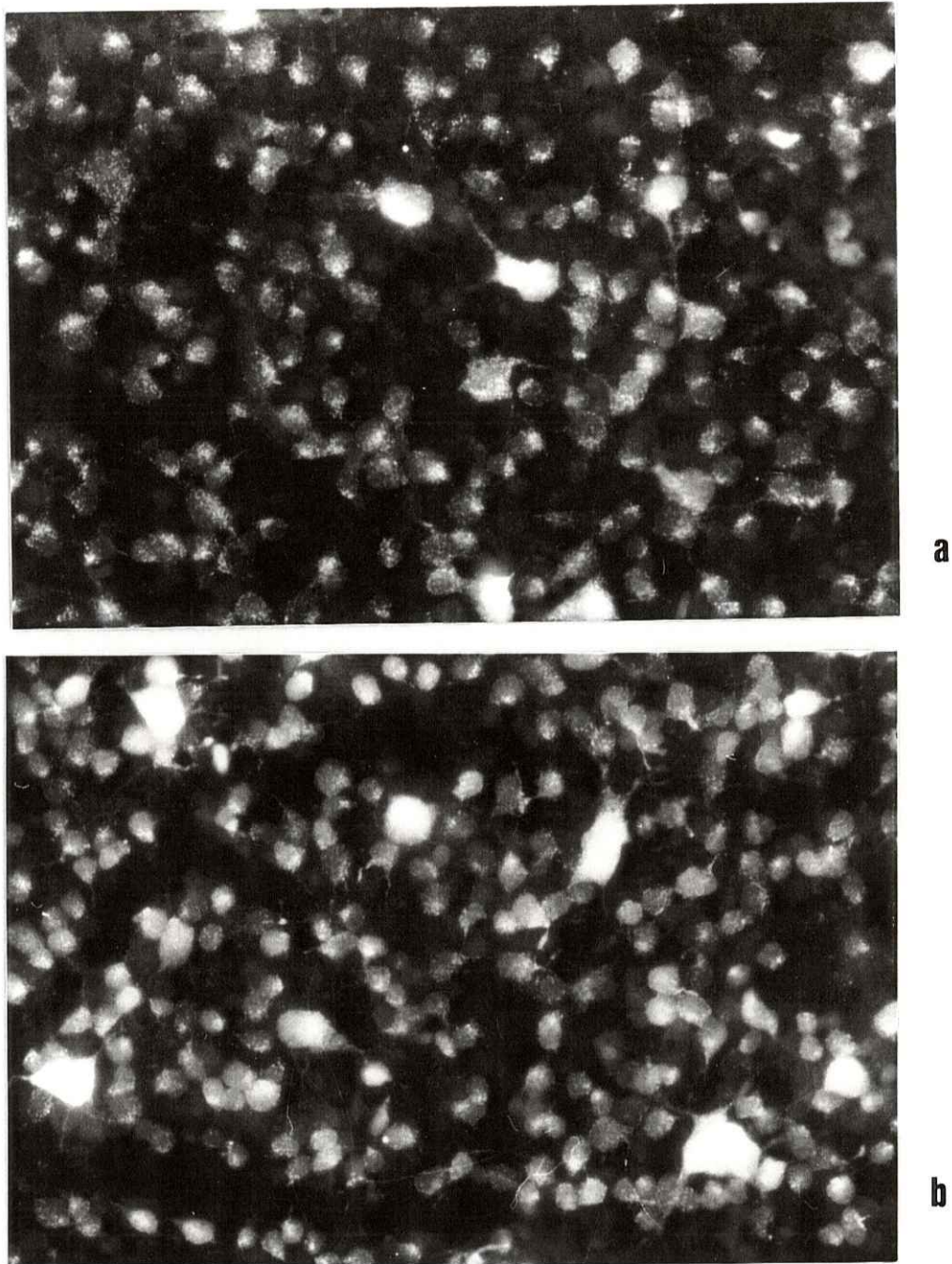


Fig. 5. Fotografías ($\times 342$) tomadas en el microscopio de fluorescencia de regiones representativas situadas a la misma distancia del disco óptico, correspondientes a retinas derechas o controles de animales procesados 5 (a) y 7 días (b) tras la producción de una isquemia en las retinas izquierdas (no ilustradas). Se pueden observar células ganglionares de diferente tamaño que presentan el típico marcaje del Fluorogold en el soma y dendritas primarias.

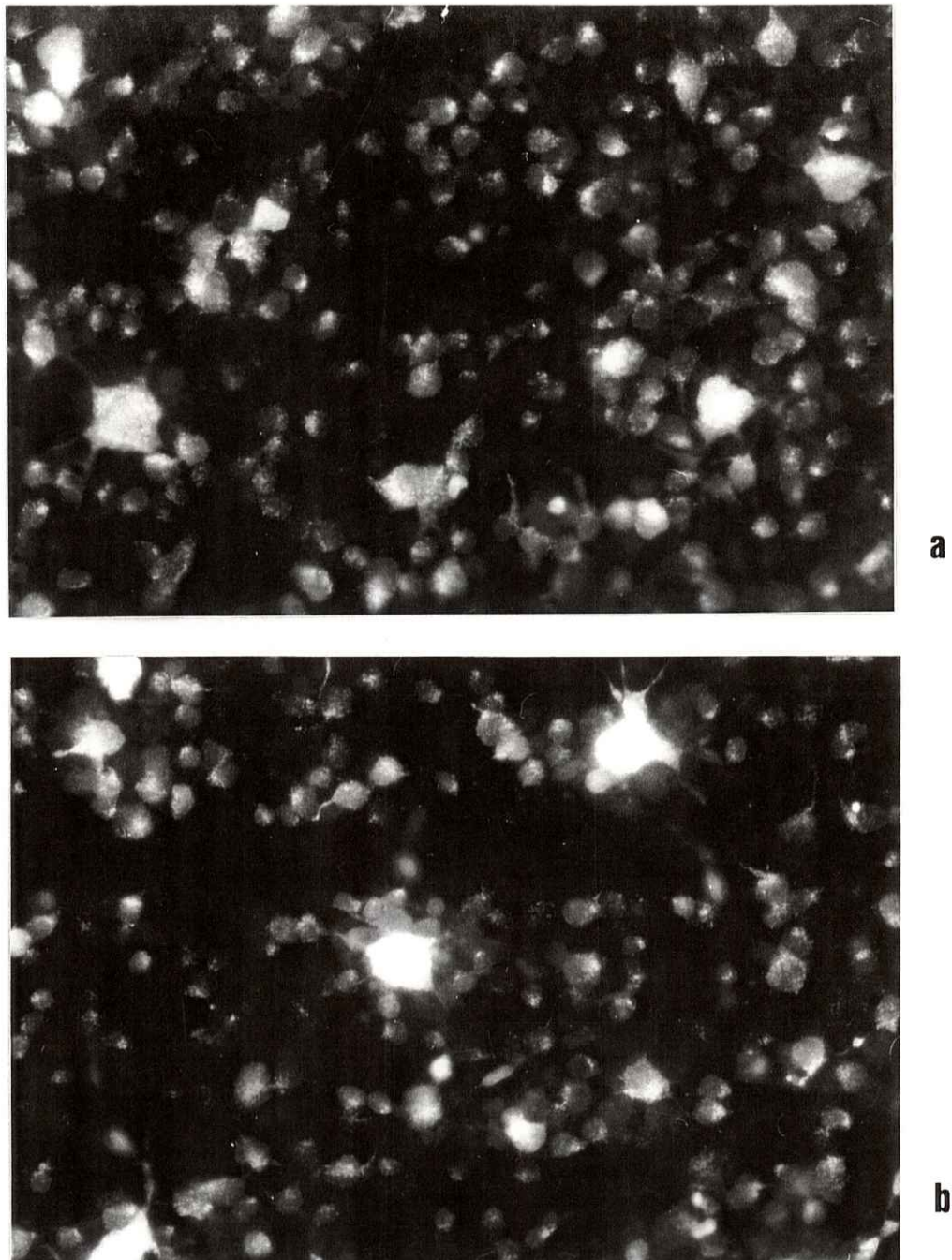


Fig. 6. Fotografías ($\times 342$) que muestran CGR marcadas con FG en retinas controles 21 (a) y 37 (b) días, respectivamente, tras la aplicación del trazador en ambos CS y NGDL. Cualitativamente no se aprecia la disminución en el número de CGR marcadas con FG en (b), sin embargo, la densidad de CGR/mm² en estas retinas era un 15% inferior con respecto a las densidades obtenidas en retinas analizadas 12, 14 y 21 días tras la aplicación del trazador.

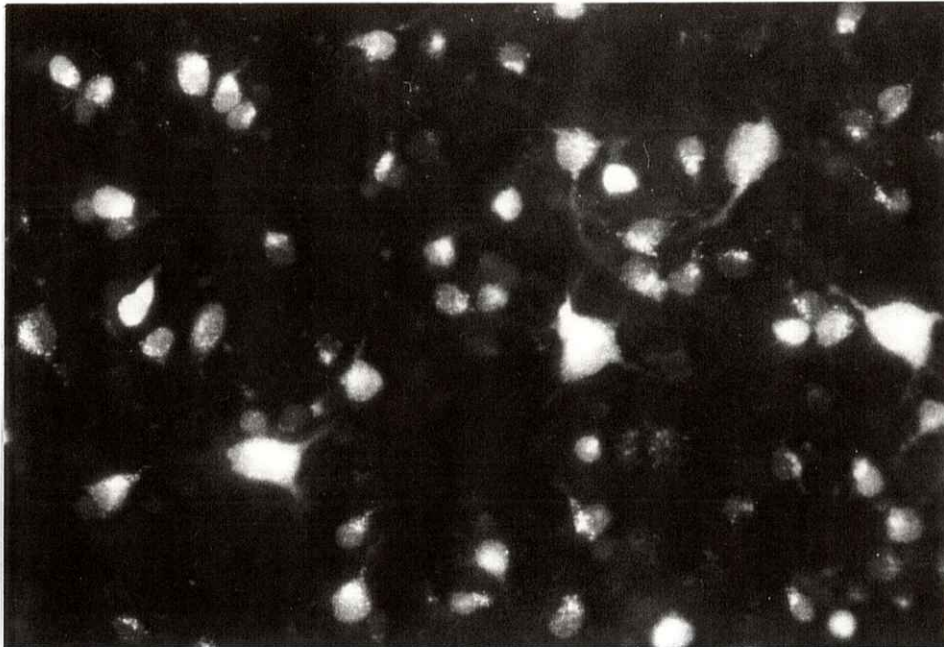


Fig 7.- Fotografía ($\times 342$) tomada al microscopio de fluorescencia, de la capa de CGR en una retina derecha o control 97 días después de la aplicación del FG en ambos CS y NGDL. Se puede apreciar una notable disminución en el número de CGR marcadas con FG que supone un 50% con respecto a las estudiadas en los animales procesados a los 12, 14 ó 21 días después de la aplicación del trazador.

4.3. SUPERVIVENCIA DE CGR TRAS DIFERENTES PERIODOS DE ISQUEMIA TRANSITORIA DE LA RETINA

Los animales fueron divididos según el tiempo de supervivencia tras la isquemia transitoria en cuatro grupos: Grupo A cuando la supervivencia fue de 30 días; Grupo B, cuando fue de 14 días; Grupo C, para 7 días; y Grupo D cuando la supervivencia postisquemia fue de 5 días. Además, dentro de cada uno de estos grupos experimentales, los animales se agruparon en diferentes subgrupos según los periodos de isquemia transitoria a los que fueron sometidos; 30, 45, 60, 75, 90, 105 ó 120 minutos.

En todos los casos el ojo derecho ha servido de control para cada animal, y el ojo izquierdo siempre ha sido el experimental. Hemos estimado el porcentaje la supervivencia de las CGR sometidas a cada período de isquemia, comparando las densidades obtenidas en las retinas derechas o controles con las izquierdas o experimentales, y considerando que las CGR marcadas con FG en las retinas derechas representan el 100% para cada grupo de animales con un mismo periodo de supervivencia.

GRUPO A: Estimación de la densidad de CGR (CGR/mm²) tras un intervalo de supervivencia del animal de 30 días, transcurridos desde el momento que finalizó la isquemia.

Treinta días es el período de supervivencia tras isquemia retiniana más largo considerado este estudio. Las densidades medias de CGR marcadas con FG en las retinas experimentales diferían substancialmente dependiendo de la

duración del periodo de isquemia transitoria. Así para isquemias de 30 ó 45 minutos de duración (Fig. 8), las densidades medias de CGR fueron de 1809 ± 87 y 1866 ± 120 respectivamente (Tabla 3, Fig. 15). Estos valores eran similares a los obtenidos en las retinas controles o contralaterales, indicando que estos períodos de isquemia transitoria no inducen muerte de CGR. No se observaron alteraciones con respecto a sus controles en la valoración del estado de la retina, tanto en su grosor cuando se realizó la disección de la retina y preparación del montaje "in toto", como en la observación de las preparaciones al microscopio de fluorescencia. Las CGR marcadas con FG se apreciaban con nitidez, y no se observaban células de la microglia teñidas con FG.

Sin embargo, en el grupo de retinas analizadas tras 60 minutos de isquemia transitoria (Fig. 10), se apreciaba en la mayoría de preparaciones la presencia de células microgliales en la capa de CGR. Estas células microgliales se identificaron fácilmente por su soma pequeño e irregular, aspecto alargado y/o ramificaciones dendríticas tortuosas. La densidad media de CGR marcadas con FG en este subgrupo de animales había disminuido hasta 826 ± 159 (Fig. 15), valor que corresponde aproximadamente al 45% de la población de CGR estimada en las retinas controles o contralaterales. Cuando se compararon las densidades medias (tabla 3) de retinas sometidas a 60 minutos de isquemia con las densidades medias de retinas sometidas a isquemias de 30 ó 45 minutos, se observaron en ambos casos diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.004$; test de Mann-Whitney).

La densidades medias de CGR marcadas con FG (fig.15) mostraban reducciones aún mayores en los grupos de retinas sometidas a periodos de isquemia transitoria de 75 y 90 minutos (Figs. 9, 10), En estos subgrupos se observó que los porcentajes de supervivencia de las CGR del 24 y 4%

respectivamente (Fig.15). Cuando se compararon las densidades medias obtenidas tras 60, 75 ó 90 minutos de isquemia transitoria se observaron diferencias significativas en todos los casos ($P < 0,006$; test de Mann-Whitney).

Las retinas sometidas a tiempos iguales o mayores de 90 minutos (Fig.12 y 14) de isquemia eran mucho más finas y friables con respecto a sus controles, lo que hacía difícil su manipulación. A través del microscopio de fluorescencia se apreciaba un escaso número de CGR marcadas con FG y muchas células de la microglía. Finalmente, las retinas que sufrieron periodos transitorios de isquemia de 105 ó 120 minutos presentan una densidad media de CGR marcadas con FG del 8 y 5% respectivamente con los grupos de retinas contralateral (fig.13). Estos valores no difieren estadísticamente de los obtenidos en el grupo analizado tras 90 minutos de isquemia.

Este grupo experimental fue el primero que diseñamos y analizamos, pensando que 30 días tras el período transitorio de isquemia, permitiría la eliminación de aquellas células muertas y de sus detritus marcados con FG y por ende un estudio cuantitativo de la supervivencia de CGR a dicha injuria. A continuación una vez establecido el efecto de diferentes períodos de isquemia transitoria pretendimos analizar si existía un proceso evolutivo en la muerte de las CGR a lo largo del tiempo o si la muerte ocurría en los primeros días, sin modificación posterior en el grado de supervivencia de las CGR inducida por la isquemia transitoria, para ello preparamos y analizamos otra serie de animales de forma similar al descrito, en los que la supervivencia tras la isquemia fue de 14, 7 y 5 días.

Tiempo de isquemia (minutos)	Retina derecha (control)	Retina izquierda (experimental)
30	1484 2198 2085 1799 1802 1902 1819	1623 2048 1945 1716 1785 1908 1636
Media \pm ESM % Supervivencia	1869 \pm 87	1808 \pm 61 98%
45	1868 1995 2167 1807 2084 2153	1969 1631 2209 1490 1735 2162
Media \pm ESM % Supervivencia	2012 \pm 61	1842 \pm 120 93%
60	1711 1814 1664 1730 1638 2057 2283	844 521 770 1312 1399 736 198
Media \pm ESM % Supervivencia	1842 \pm 91	826 \pm 159 (*) 45%
75	1872 1907 1644 1860 1508	651 332 150 416 579
Media \pm ESM % Supervivencia	1758 \pm 78	426 \pm 89 (*) 24%
90	1523 2003 2098 1465 1871	120 110 59 33 41
Media \pm ESM % Supervivencia	1792 \pm 127	73 \pm 18 (*) 4%
105	1867 1598 1898 1470 2081	37 123 212 11 354
Media \pm ESM % Supervivencia	1782 \pm 10	147 \pm 62 (*) 8%
120	1615 1865 1830 1996 1914 2289	40 115 109 190 61 83
Media \pm ESM % Supervivencia	1918 \pm 91	100 \pm 21 (*) 5%

TABLA (3): Densidades de CGR marcadas con FG, 30 días después de la isquemia transitoria. (*) Diferencias significativas con respecto a sus controles. Test de Mann-Whitney (P<0,05).

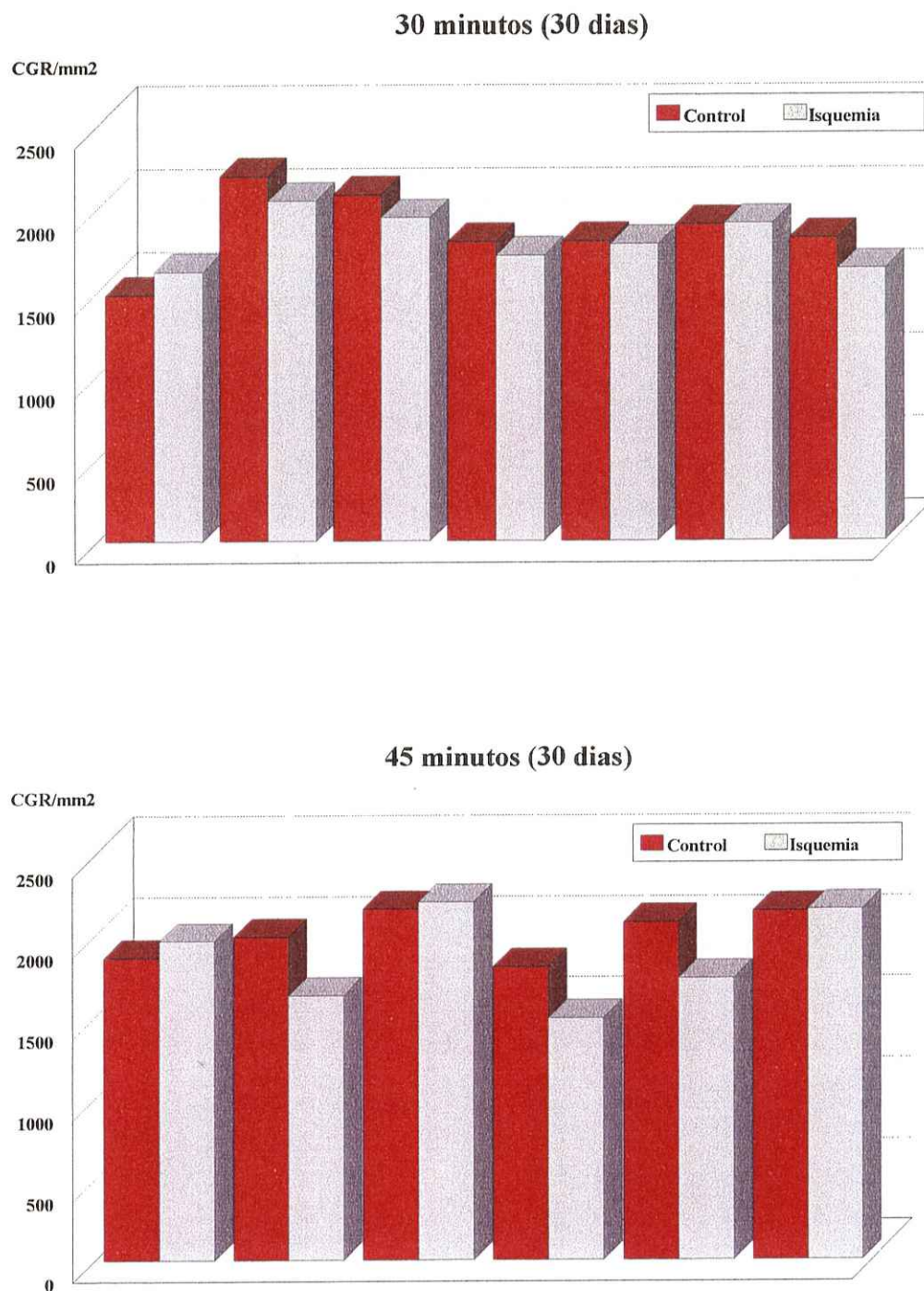


Fig. 8. Densidades medias de CGR marcadas con fluorogold tras un intervalo de supervivencia de 30 días y períodos transitorios de isquemia de 30 minutos (superior) y 45 minutos (inferior). Cada par de barras representa la densidad obtenida en la retina control e isquémica de cada uno de los animales.

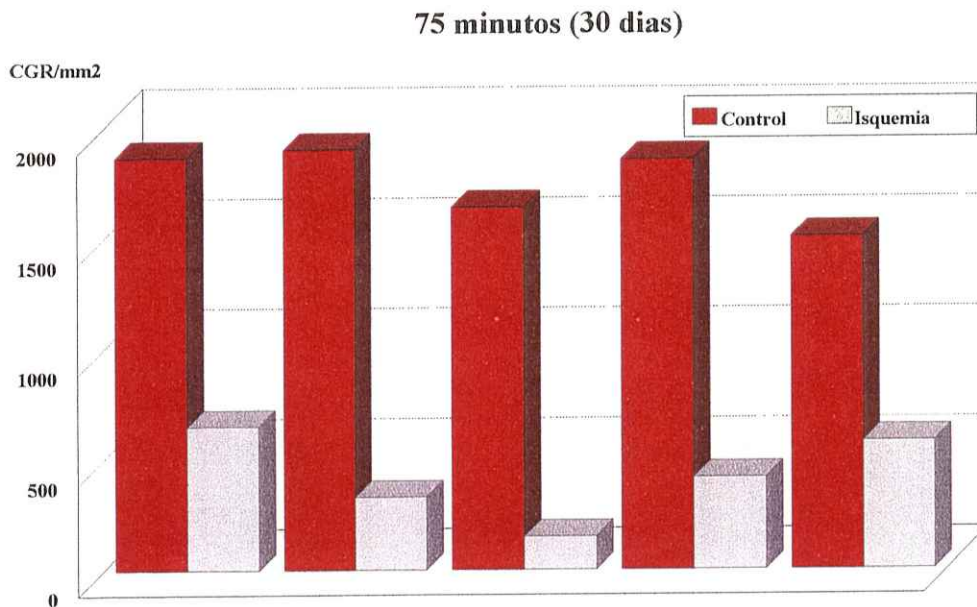
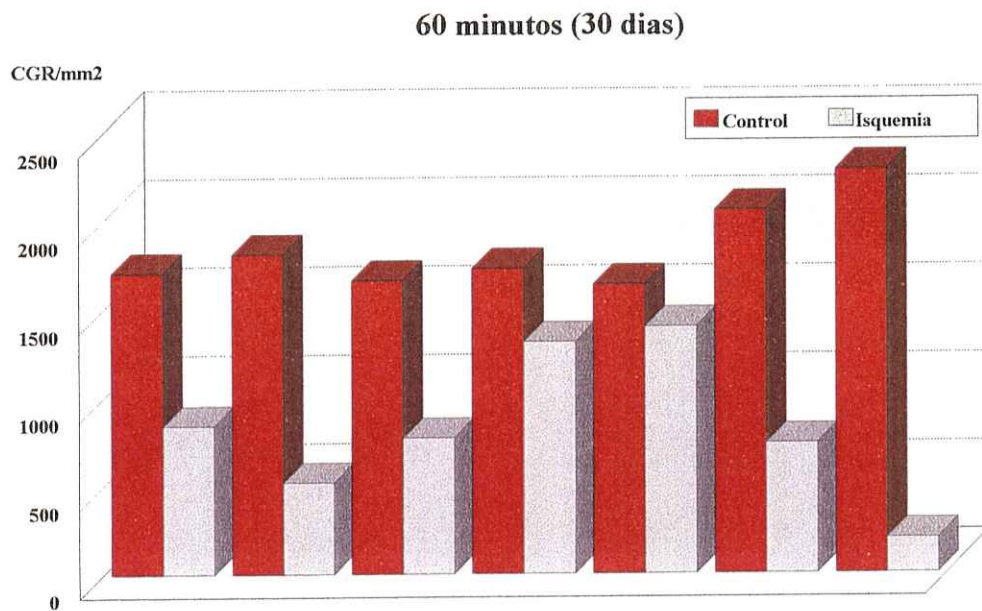


Fig. 9. Densidades medias de CGR marcadas con fluorogold tras un intervalo de supervivencia de 30 días y períodos transitorios de isquemia de 60 minutos (superior) y 75 minutos (inferior). Cada par de barras representa la densidad obtenida en la retina control e isquémica de cada uno de los animales analizados.

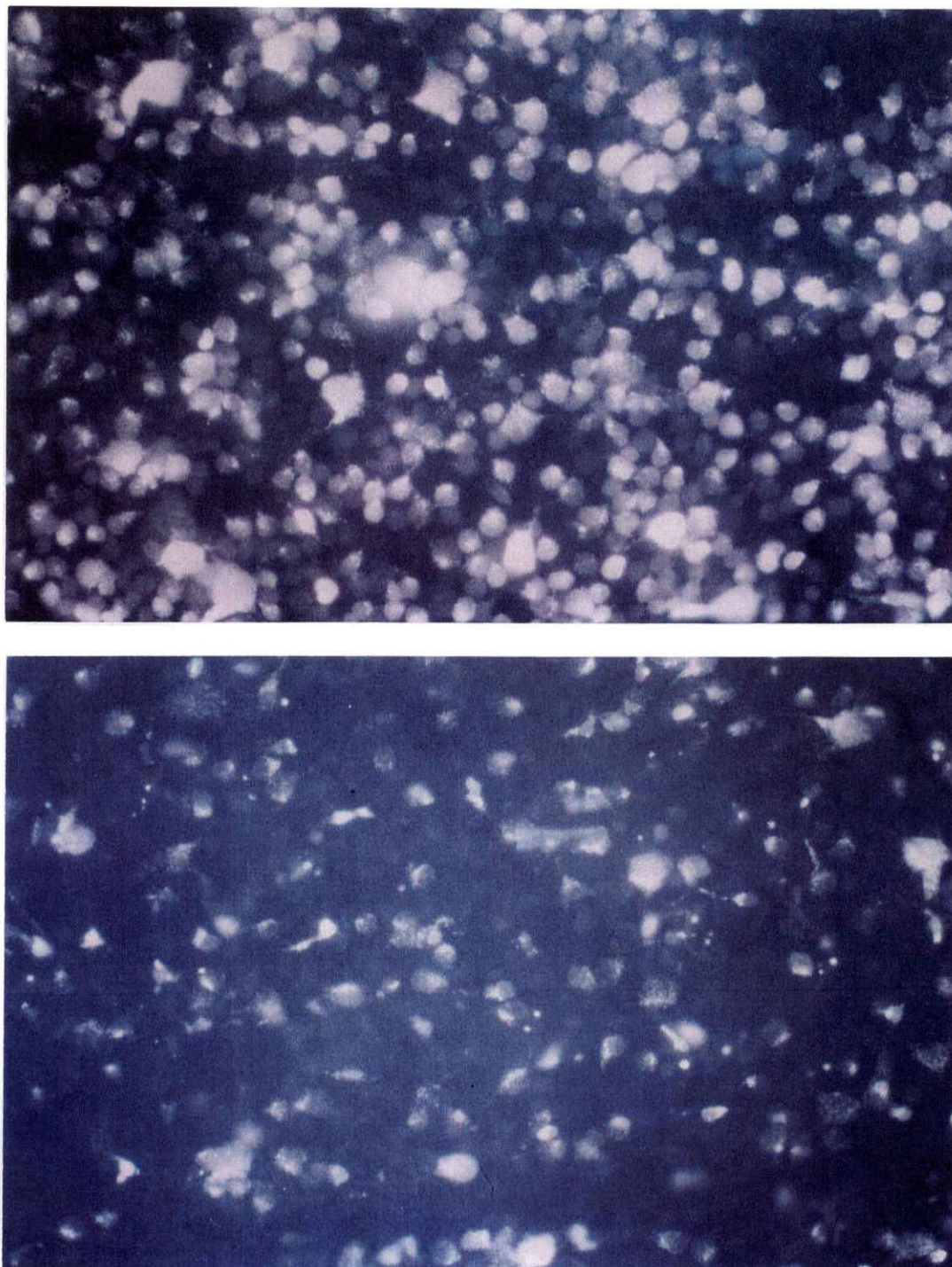


Fig. 10. Fotografías ($\times 320$) de regiones similares de las retinas derecha (arriba) e izquierda (abajo) de una rata, procesada a los 30 días de someter la retina izquierda a una isquemia transitoria de 60 minutos. En la retina control o derecha (a) se observa el aspecto típico de CGR marcadas con FG. En la retina izquierda (b), isquemiada durante 60 minutos, se aprecia una disminución del número de CGR marcadas con FG.



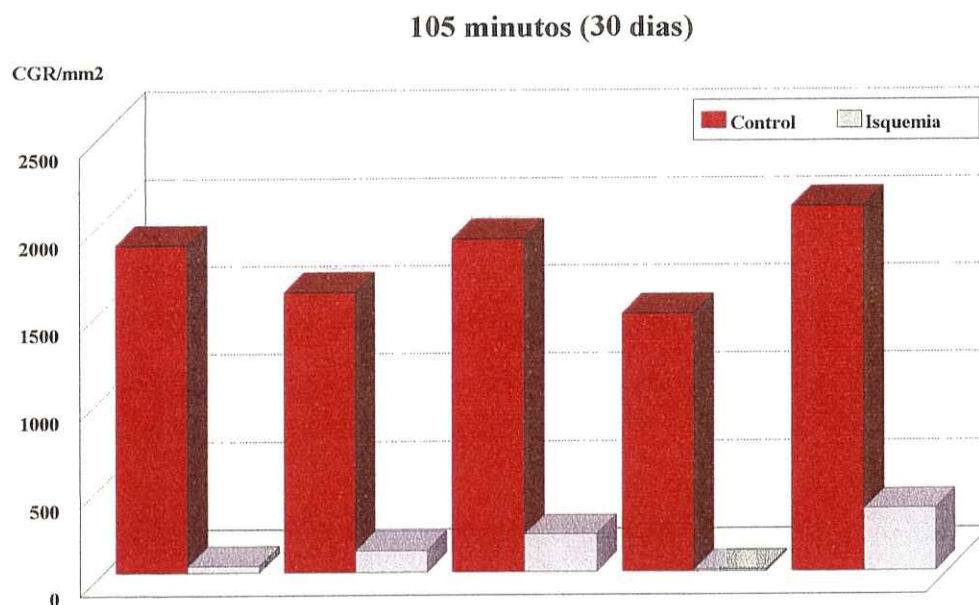
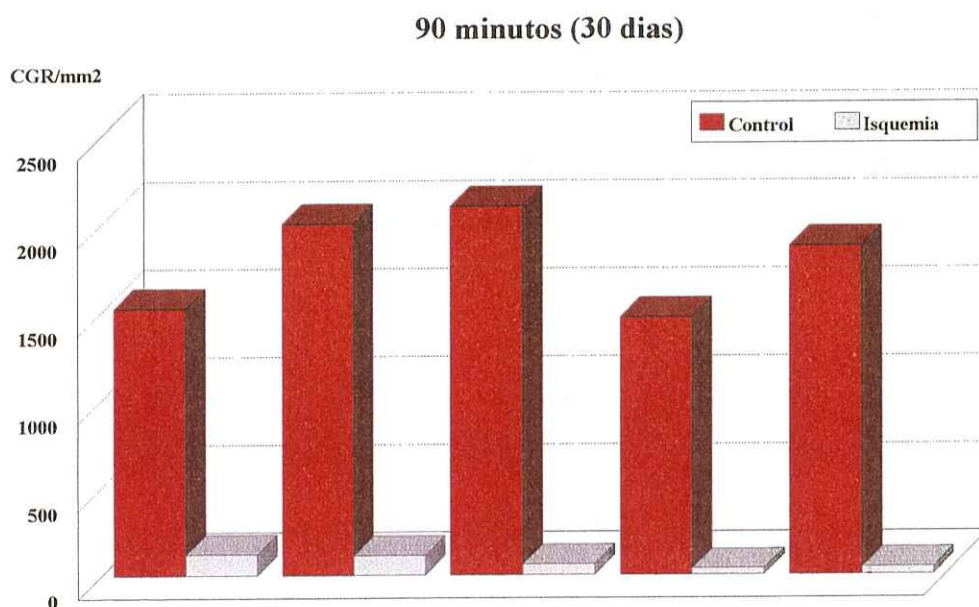


Fig. 11. Densidades medias de CGR marcadas con fluorogold tras un intervalo de supervivencia de 30 días y periodos transitorios de isquemia de 90 (superior) y 105 (inferior) minutos, respectivamente. Cada par de barras representa la densidad obtenida en la retina control e isquémica de cada uno de los animales analizados en estos subgrupos.

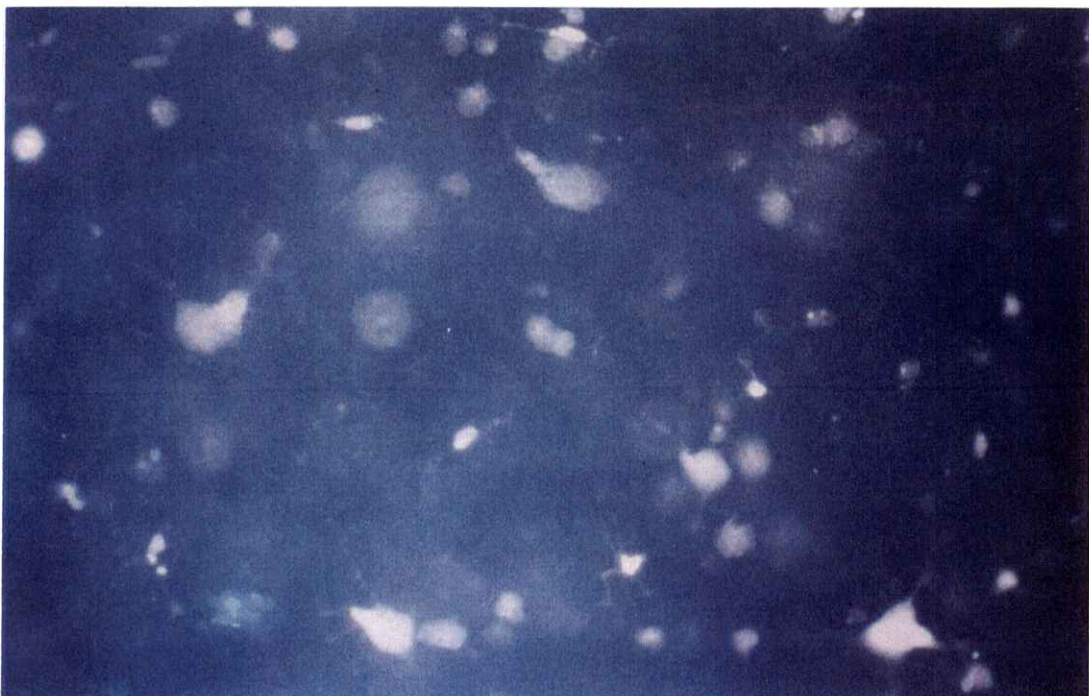
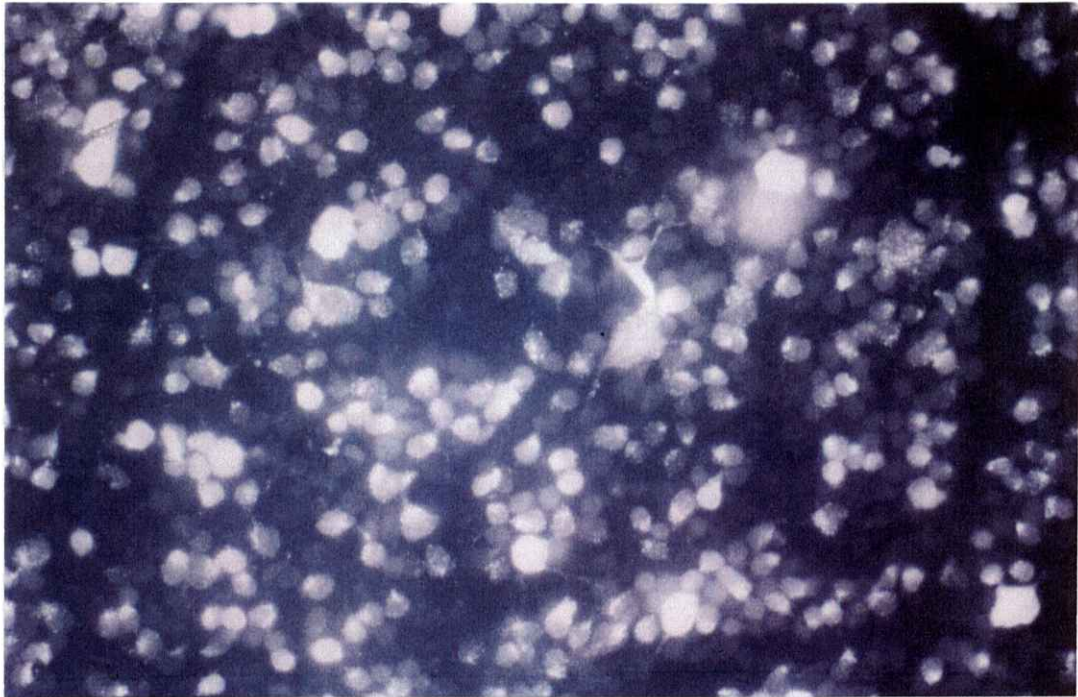


Fig.12. Fotografías ($\times 320$) de regiones similares de retinas derecha (arriba e izquierda (abajo) de una rata procesada a los 30 días de someter la retina izquierda a una isquemia transitoria de 90 minutos. En la retina control se observa el aspecto típico de CGR marcadas con FG. En la retina izquierda, se aprecia una gran disminución en el número de CGR marcadas con FG.

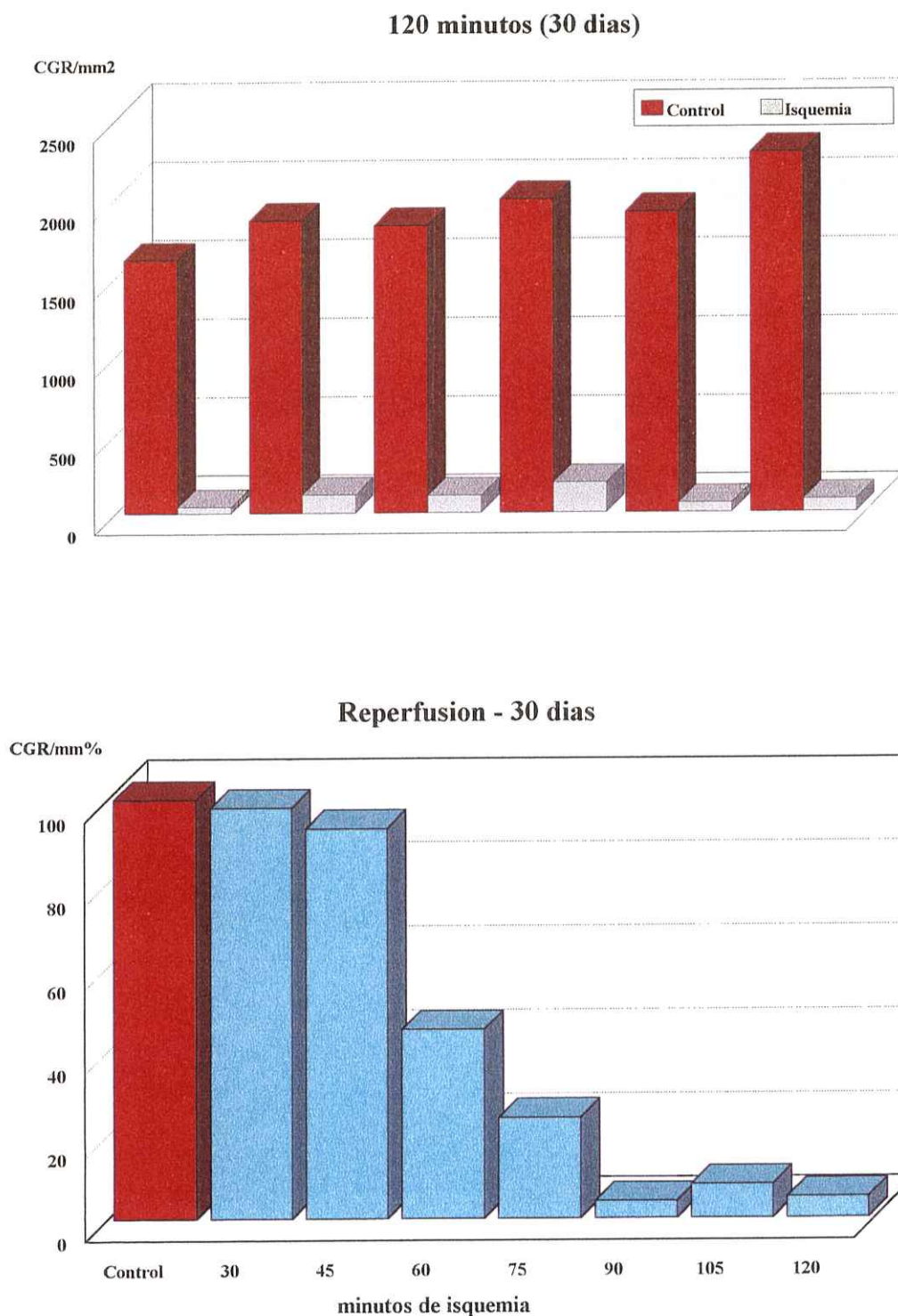


Fig. 13. En la parte superior se representan las densidades medias de CGR marcadas con fluorogold tras un intervalo de supervivencia de 30 días y un periodo transitorio de isquemia de 120 minutos. Cada par de barras representa la densidad obtenida en la retina control e isquémica de cada uno de los animales analizados en este subgrupo.

En la parte inferior se representan las densidades medias expresadas en tanto por cien con respecto a las de sus controles para cada uno de los subgrupos analizados tras diferentes periodos de isquemia transitoria.

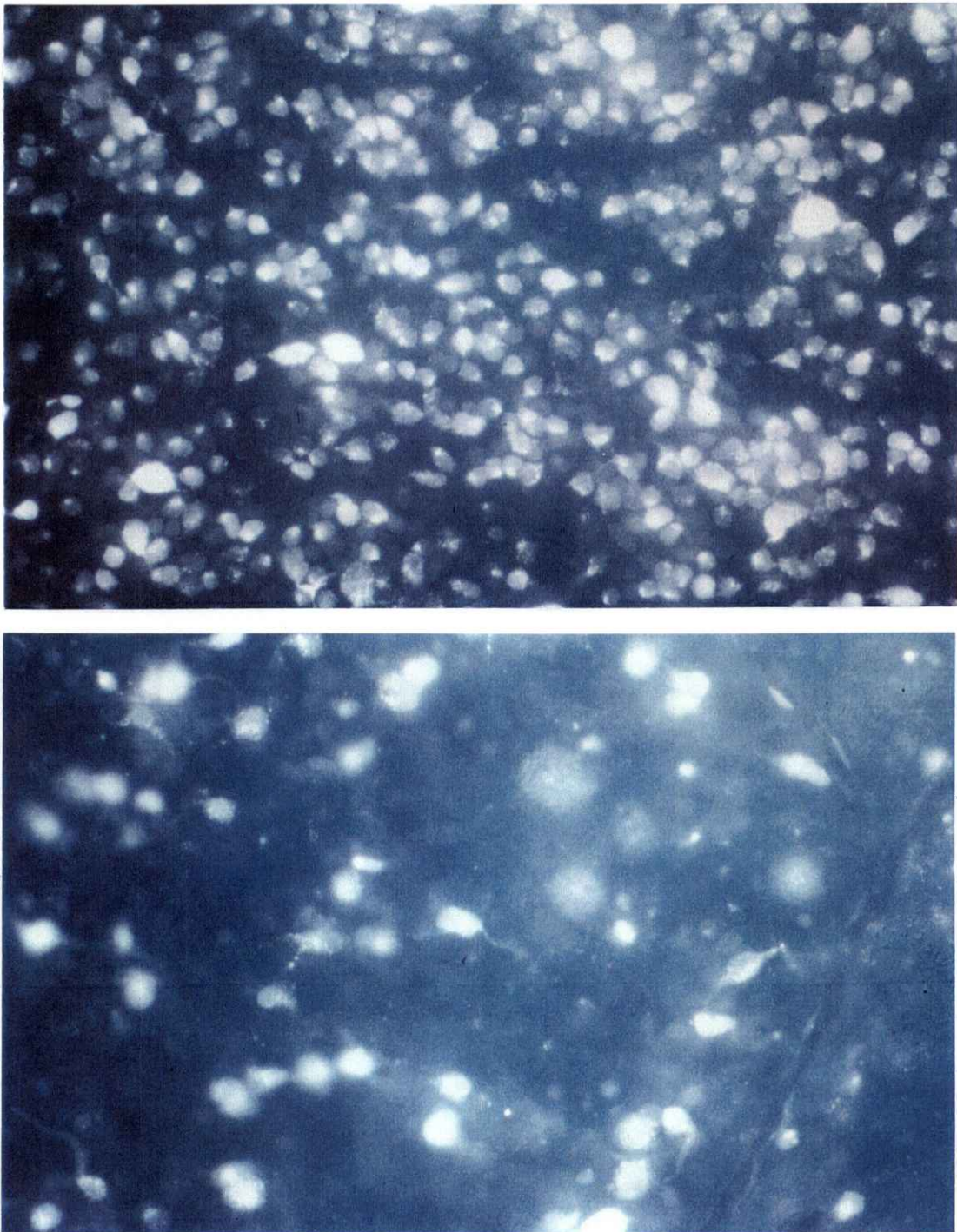


Fig. 14. Fotografías ($\times 320$) obtenidas de la retina derecha o control (arriba) y de la izquierda o experimental (abajo) de un animal sometido a 120 minutos de isquemia transitoria tras un intervalo de supervivencia de 30 días. Mientras que la retina control (a) presenta el típico aspecto de una retina normal, la retina isquémica (b) muestra un pequeño número de CGR marcadas con FG. La muerte de CGR sometidas a isquemia transitoria de 120 minutos es de aproximadamente un 95 % con respecto a las retinas control.

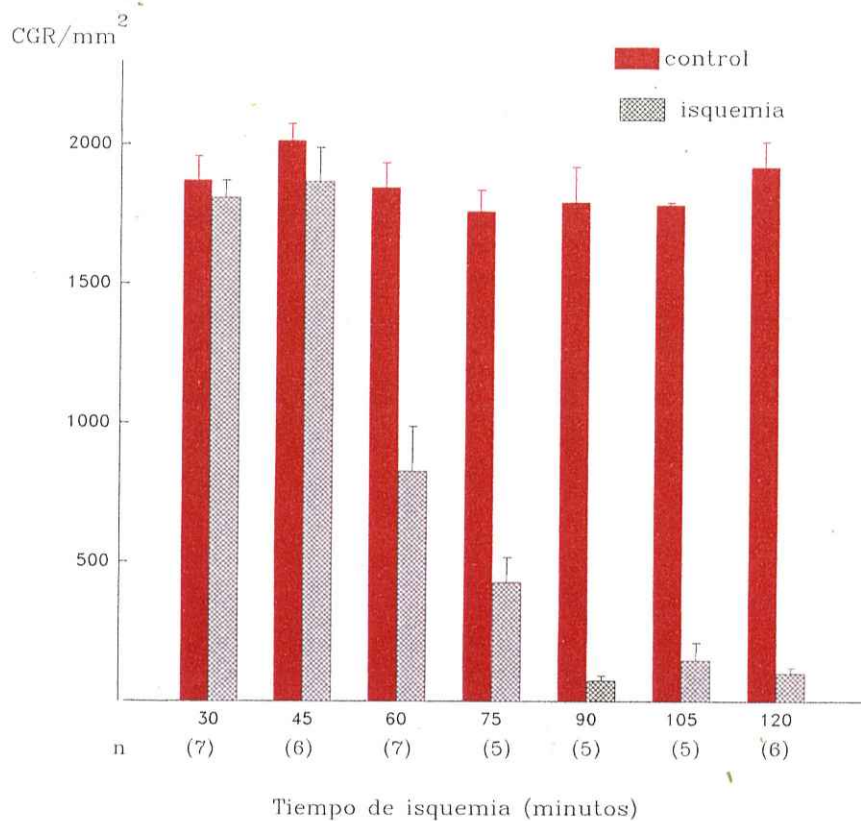


Fig. 15. Densidades medias \pm ESM de CGR marcadas con FG en retinas controles y experimentales obtenidas a los 30 días de diferentes periodos de isquemia transitoria de 30, 45, 60, 75, 90, 105 y 120 minutos, respectivamente. En el eje de abscisas vienen representados los diferentes periodos de isquemia y el número de animales examinados. Se puede apreciar la marcada reducción en la densidad de CGR que aparece en las retinas experimentales a los 60 minutos con respecto a las obtenidas para 30 y 45 minutos de isquemia ($P < 0,004$). La muerte de CGR continúa progresando conforme se incrementa el periodo de isquemia, de manera que las densidades para 60 minutos de isquemia son significativamente diferentes con respecto a las obtenidas para 75 minutos ($P < 0,002$), y las de 75 minutos con respecto a las obtenidas a los 90 minutos ($P < 0,004$). Sin embargo las densidades obtenidas en retinas sometidas a periodos de isquemia transitoria de 90 minutos o más, no son estadísticamente diferentes. (test de Mann-Whitney).

GRUPO B: Estimación de la densidad de CGR (CGR/mm²) tras un periodo de supervivencia del animal de 14 días, transcurridos desde el momento que finalizó la isquemia.

Para este grupo experimental la densidad media de CGR en las retinas izquierdas de los animales sometidos a períodos de isquemia de 30 y 45 minutos fue de 2243±63 y 1956±146 respectivamente. Estos valores eran similares a los obtenidos en las retinas controles o contralaterales correspondientes. (Tabla.4), (figs. 16, 20).

En las retinas analizadas tras 60 minutos de isquemia transitoria (Fig.17), la densidad media de CGR fue de 1119±21, que corresponde al 51% de la densidad de CGR marcadas con FG (Fig.19) en las retinas contralaterales o controles. Cuando se compararon con las densidades medias obtenidas en las retinas sometidas a 30 y 45 minutos de isquemia las diferencias fueron estadísticamente significativas (P<0,03; test de Mann-Whitney). La observación microscópica de las preparaciones mostraba un aspecto similar a las descritas en el Grupo A para este tiempo de isquemia.

Cuando la duración de la isquemia fue de 75 minutos (Fig.17) la densidad media de CGR/mm² descendió a 391±89 que supone un 18% con respecto a los valores de las retinas contralaterales. Cuando se compararon las densidades de CGR marcadas con FG obtenidas en las retinas sometidas a isquemias de 60 ó 75 minutos, las diferencias fueron estadísticamente significativas (p< 0,003, test de Mann-Whitney).

Tras períodos de isquemia de 90 minutos (Fig.18) la densidad media de CGR/mm² fue de 348±44 (Fig.20), para períodos de 105 minutos la densidad

obtenida fue de 294 ± 98 CGR/mm², y cuando la duración de la isquemia fue de 120 minutos (Fig.19) las densidades medias obtenidas fueron de 413 ± 188 (Tabla.4). No se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre estos tres valores obtenidos tras períodos de isquemia de 90, 105 ó 120 minutos.

Tiempo de isquemia (minutos)	Retina derecha (control)	Retina izquierda (experimental)
30	2136	2084
	2351	2474
	2257	2071
	2236	2255
	2703	2370
	2517	1947
	2281	2368
	2119	2350
	Media \pm ESM % Supervivencia	2325 \pm 70
45	1702	1575
	1875	1843
	2635	2377
	2263	2203
	2164	1785
	Media \pm ESM % Supervivencia	2127 \pm 62
60	1977	1724
	1937	532
	1941	603
	2340	762
	2329	565
	2298	2168
	2225	1265
	2330	1339
	Media \pm ESM % Supervivencia	2172 \pm 65
75	1835	429
	2285	356
	2215	210
	2402	495
	2188	509
	2093	355
	Media \pm ESM % Supervivencia	2169 \pm 79
90	2187	393
	1540	495
	2523	321
	2223	236
	2430	297
Media \pm ESM % Supervivencia	2181 \pm 172	348 \pm 44 (*) 16%
105	1913	173
	2468	585
	2333	249
	2191	170
Media \pm ESM % Supervivencia	2226 \pm 119	294 \pm 98 (*) 13%
120	2124	493
	2296	47
	2131	209
	2468	218
	2522	1306
	2293	205
	Media \pm ESM % Supervivencia	2305 \pm 67

TABLA (4): Densidades de CGR marcadas con FG, 14 días después de la isquemia transitoria. (*) Diferencias significativas con respecto a sus controles. Test de Mann-Whitney ($P < 0,05$).

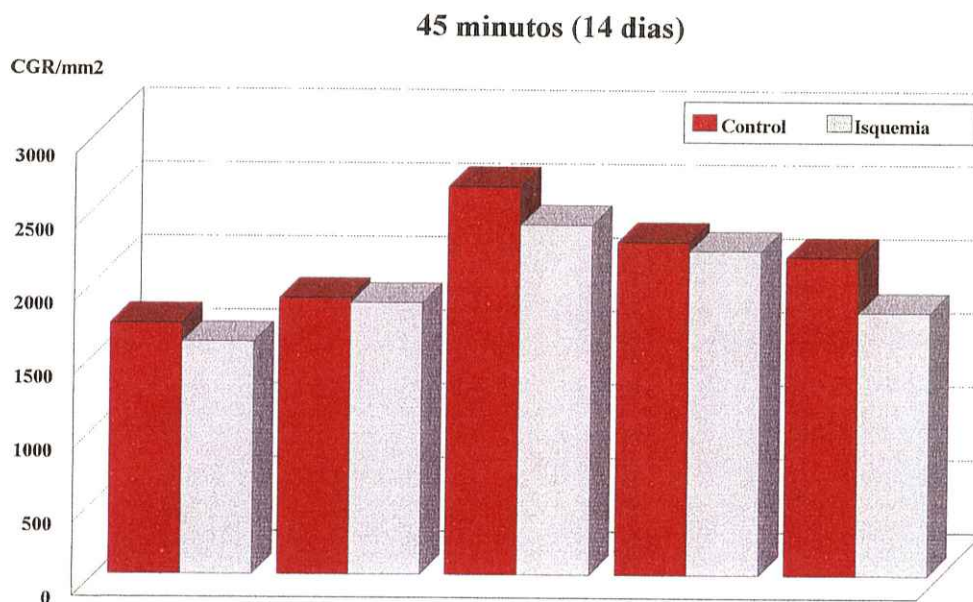
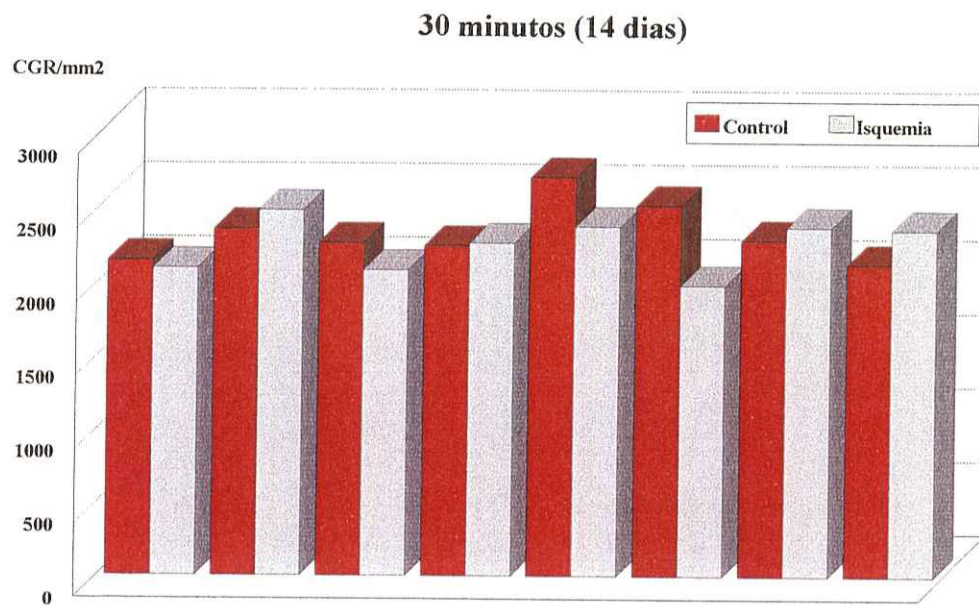


Fig. 16. Densidades medias de CGR marcadas con fluorogold en retinas de animales del grupo B, con un intervalo de supervivencia de 14 días, tras sufrir períodos transitorios de isquemia de 30 minutos (superior) y 45 minutos (inferior). Cada par de barras representa la densidad obtenida en la retina control e isquémica de cada uno de los animales.

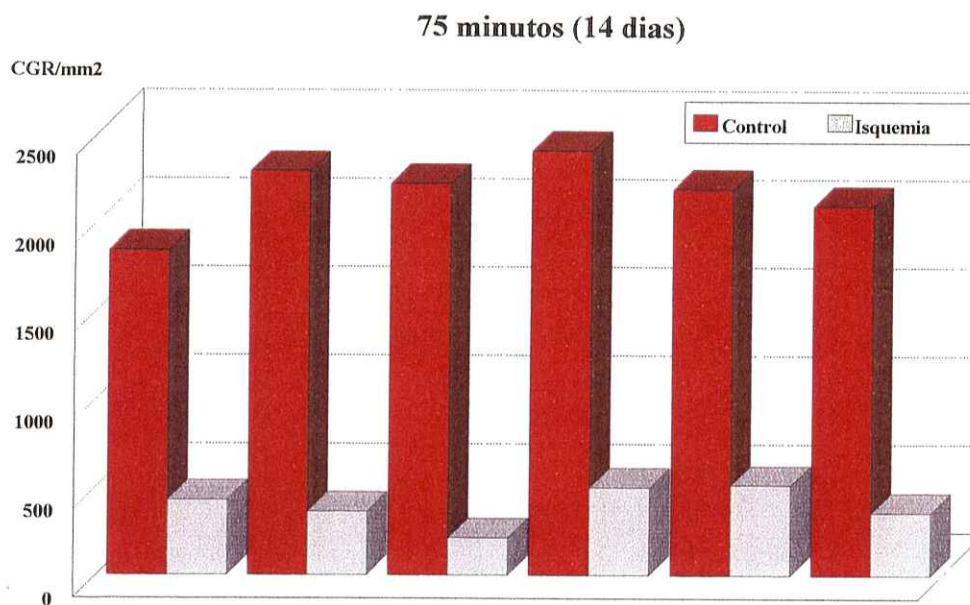
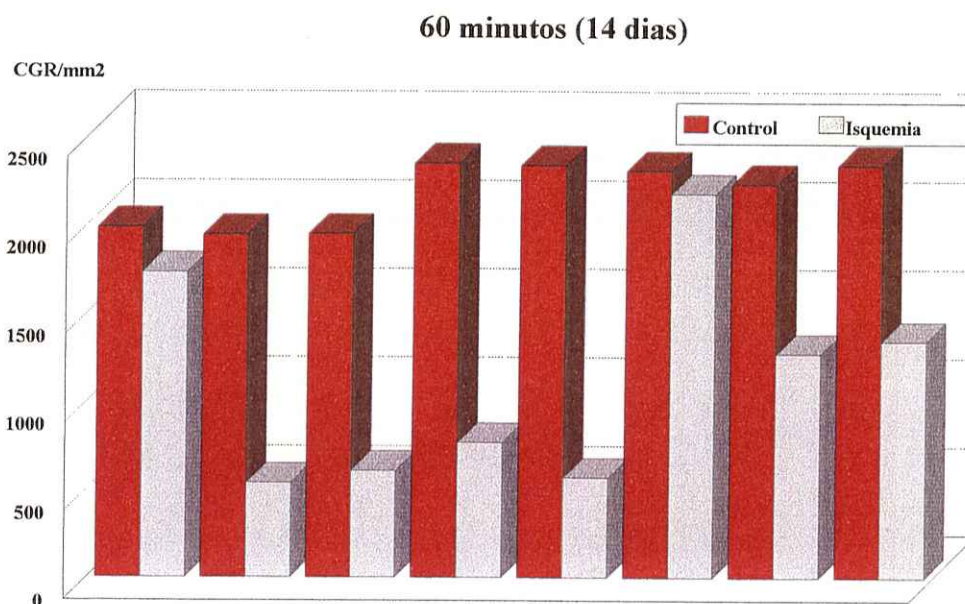


Fig. 17. Densidades medias de CGR marcadas con fluorogold tras un intervalo de supervivencia de 14 días y periodos transitorios de isquemia de 60 minutos (superior) y 75 minutos (inferior). Cada par de barras representa la densidad obtenida en la retina control e isquémica de cada uno de los animales analizados en estos subgrupos.

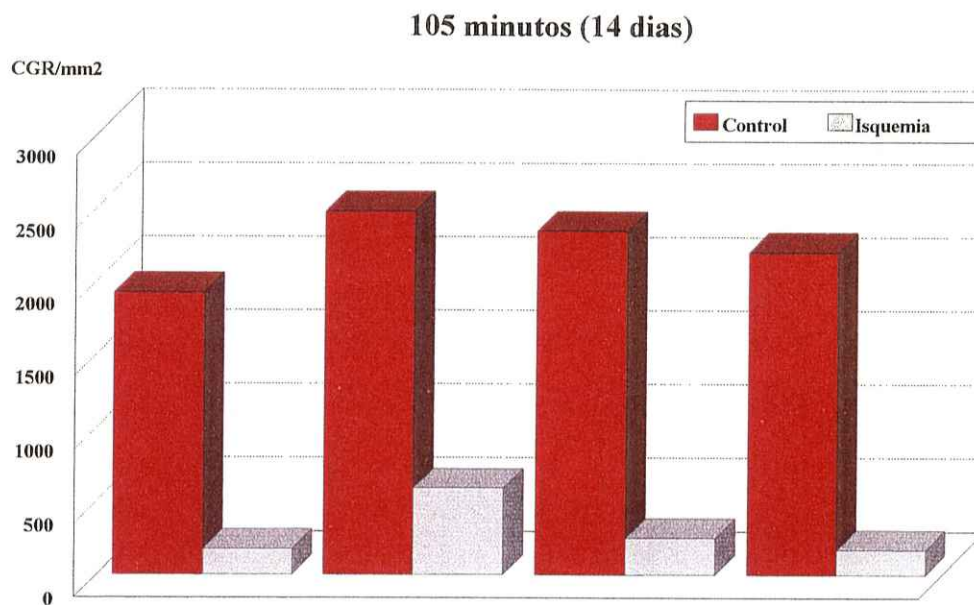
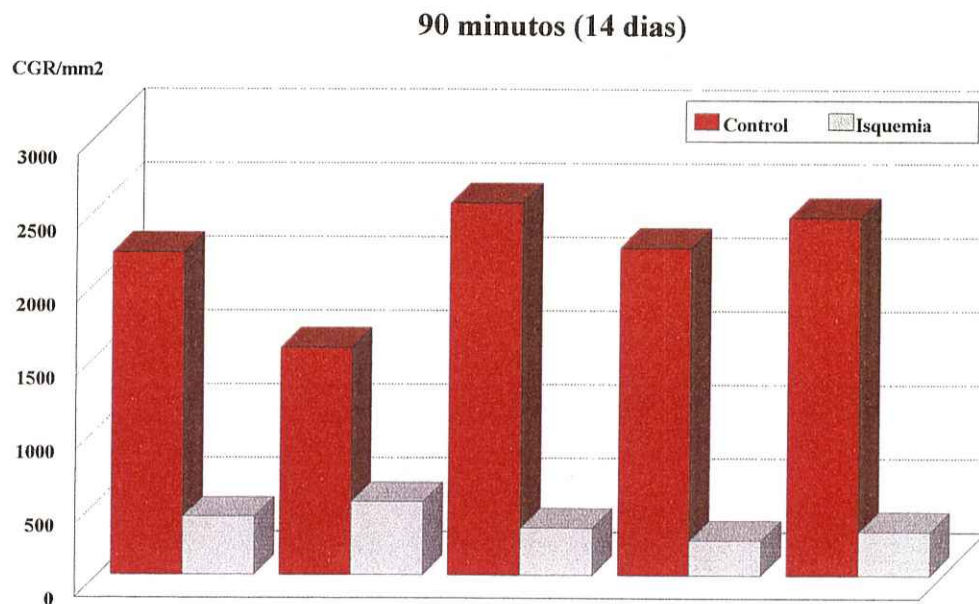


Fig. 18. Densidades medias de CGR marcadas con fluorogold en retinas de animales del grupo B, tras un intervalo de supervivencia de 14 días y periodos transitorios de isquemia de 90 minutos (superior) y 105 minutos (inferior). Cada par de barras representa la densidad obtenida en la retina control e isquémica de cada uno de los animales.

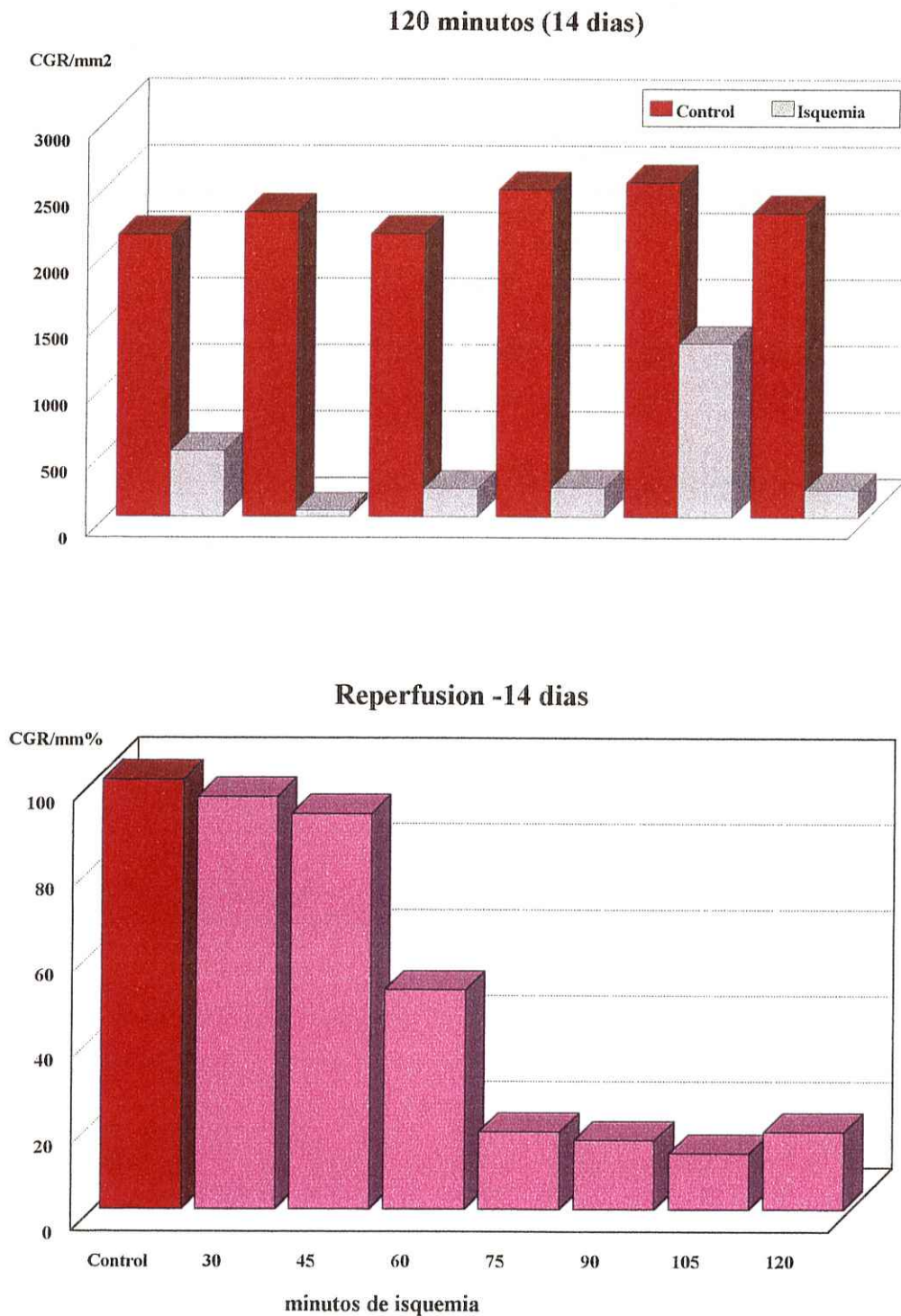


Fig. 19. En la parte superior se representan las densidades medias de CGR marcadas con fluorogold tras un intervalo de supervivencia de 30 días y un periodo transitorio de ischemia de 120 minutos. Cada par de barras representa la densidad obtenida en la retina control e isquémica de cada uno de los animales analizados.

En la parte inferior se representan las densidades medias expresadas en tanto por cien con respecto a las de sus controles para cada uno de los subgrupos analizados tras diferentes periodos de ischemia transitoria.

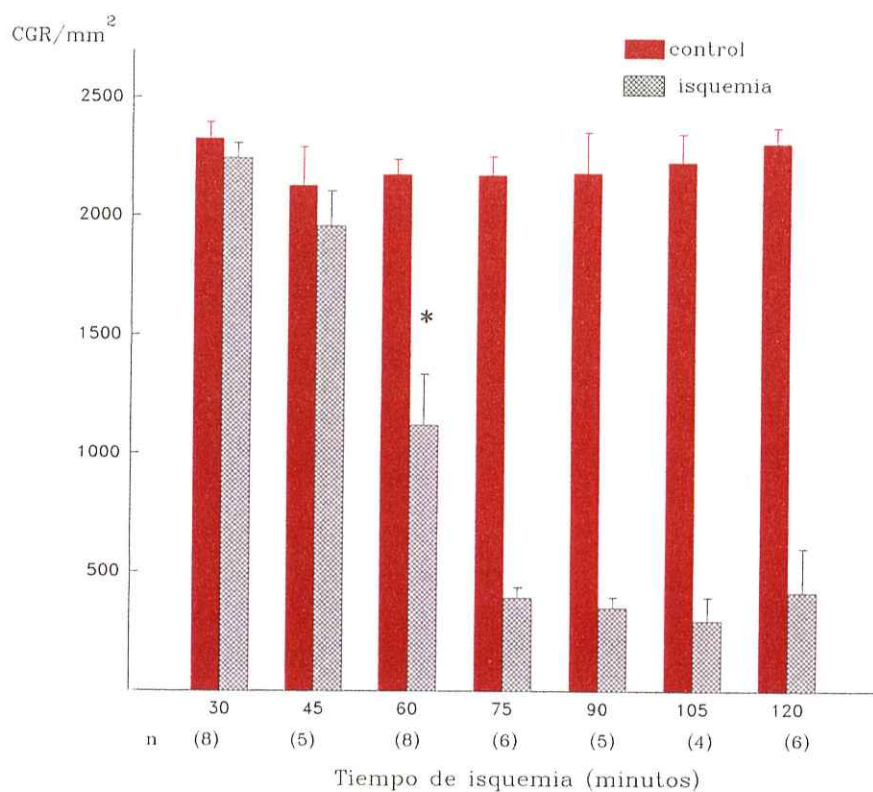


Fig. 20. Densidades medias \pm ESM de CGR marcadas con FG en retinas controles y experimentales obtenidas 14 días después de someter la retina izquierda a diferentes períodos de isquemia transitoria de 30, 45, 60, 75, 90, 105 y 120 minutos, respectivamente. En el eje de abscisas vienen representados los diferentes periodos de isquemia y el número de animales examinados. (*) indica el período de isquemia en el que la reducción del número de CGR comparada con su control, comienza a ser significativa ($P < 0,05$; Test de Mann-Whitney). No se observó una diferencia significativa entre las densidades de CGR marcadas con FG para periodos de isquemia transitoria de 75, 90, 105 y 120 minutos.

GRUPO C: Estimación de la densidad de CGR/mm² tras un periodo de supervivencia del animal de 7 días, transcurridos desde el momento que finalizó la isquemia. (Figs. 16- 20; Tabla 5).

Las densidades de CGR marcadas con FG obtenidas para tiempos de isquemia de 30 y 45 minutos fueron de 2235±98 y 2033±151, respectivamente. Al igual que en los grupos anteriores no se mostraron diferencias estadísticamente significativas con respecto de las densidades celulares obtenidas en las retinas derechas o controles. Cuando el periodo de isquemia al que fue sometida la retina era de 60 minutos, las densidades medias de CGR marcadas con FG fueron de 1539±335. No se observaron diferencias significativas entre las densidades obtenidas para tiempos de 30, 45 ó 60 minutos de isquemia.

Cuando el periodo de isquemia transitoria fue de 75 minutos, la densidad media de CGR marcadas con FG fue 919±160 CGR/mm², lo que suponía un 18% de CGR marcadas con FG con respecto a las que se obtuvieron en las retinas controles. Estas densidades eran estadísticamente diferentes de las obtenidas tras 30 y 45 minutos de isquemia (P< 0,04; Test de Mann-Whitney).

El recuento de CGR en retinas sometidas a 90 minutos de isquemia arrojó una densidad de 910±142 CGR/mm² marcadas con FG. Para tiempos de 105 minutos de isquemia, la densidad media obtenida fue de 944±249, y para 120 minutos estos valores fueron de 450±173. Los valores obtenidos cuando comparamos las densidades medias para cada período de isquemia con las controles fueron del 43, 40, y 22% para tiempos de isquemia de 90, 105 y 120 minutos respectivamente. No se encontraron diferencias significativas cuando se compararon entre sí los valores obtenidos para tiempos iguales o mayores de 75 minutos de isquemia, es decir, no se apreció disminución significativa en el

número de CGR marcadas con FG cuando el tiempo de isquemia se incrementaba por encima de 75 minutos.

Igualmente se observó la presencia de células de la microglia entre las CGR supervivientes marcadas con FG, en las retinas izquierdas de los subgrupos con tiempos de isquemia iguales o superiores a 60 minutos.

Tiempo de isquemia (minutos)	Retina derecha (control)	Retina izquierda (experimental)
30	2530 2223 2321 2329	2035 2184 2215 2506
Media ± ESM % Supervivencia	2368 ± 65	2235 ± 98 94%
45	1889 1818 2227 2483	1935 1688 2103 2407
Media ± ESM % Supervivencia	2104 ± 155	2033 ± 151 97%
60	2443 2209 2485 2608	1385 803 1544 2424
Media ± ESM % Supervivencia	2436 ± 83	1539 ± 335 63%
75	2219 2360 2370 2094	699 1314 622 1042
Media ± ESM % Supervivencia	2260 ± 65	919 ± 160 (*) 41%
90	2306 2126 2034 2608 ----	598 1041 616 1365 928
Media ± ESM % Supervivencia	2113 ± 60	910 ± 142(*) 43%
105	2588 2190 2381 2260	1117 1566 472 623
Media ± ESM % Supervivencia	2354 ± 87	944 ± 249(*) 40%
120	2000 2284 2045 1997	936 421 129 314
Media ± ESM % Supervivencia	2081 ± 68	450 ± 173(*) 22%

TABLA(5) : Densidades de CGR marcadas con FG, 7 días después de la isquemia transitoria. (*) muestra los períodos de isquemia que inducen muerte celular estadísticamente significativa con respecto a sus controles. Test de Mann-Whitney (P<0,05).

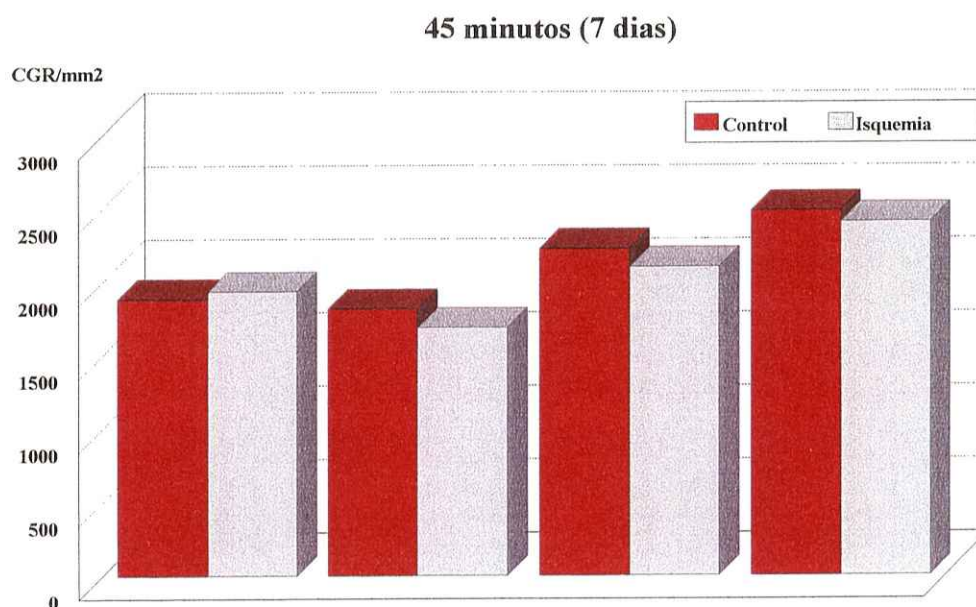
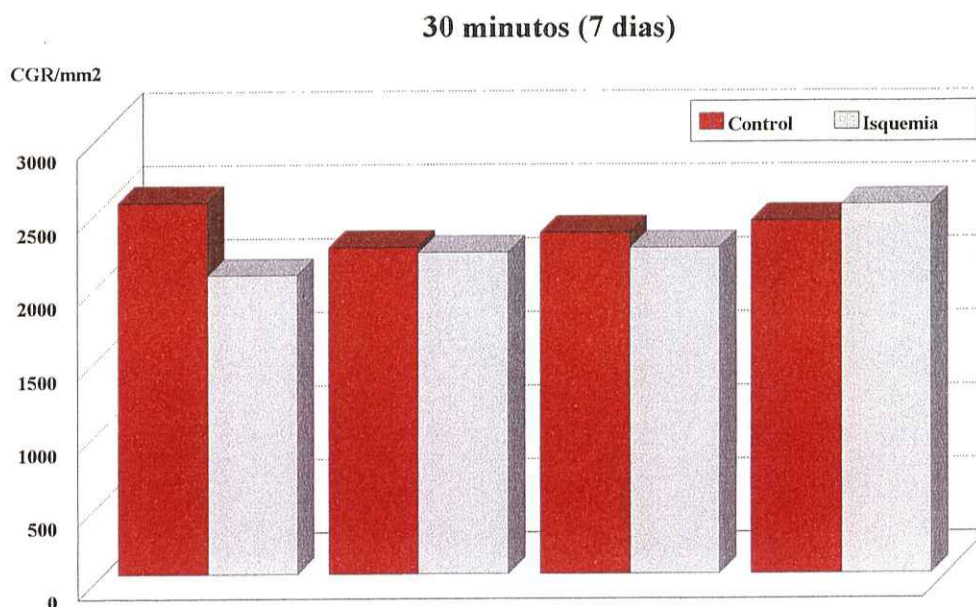


Fig. 21. Densidades medias de CGR marcadas con fluorogold en las retinas de los animales del grupo C tras un intervalo de supervivencia de 7 días y periodos transitorios de isquemia de 30 minutos (superior) y 45 minutos (inferior). Cada par de barras representa la densidad obtenida en la retina control e isquémica de cada uno de los animales analizados.

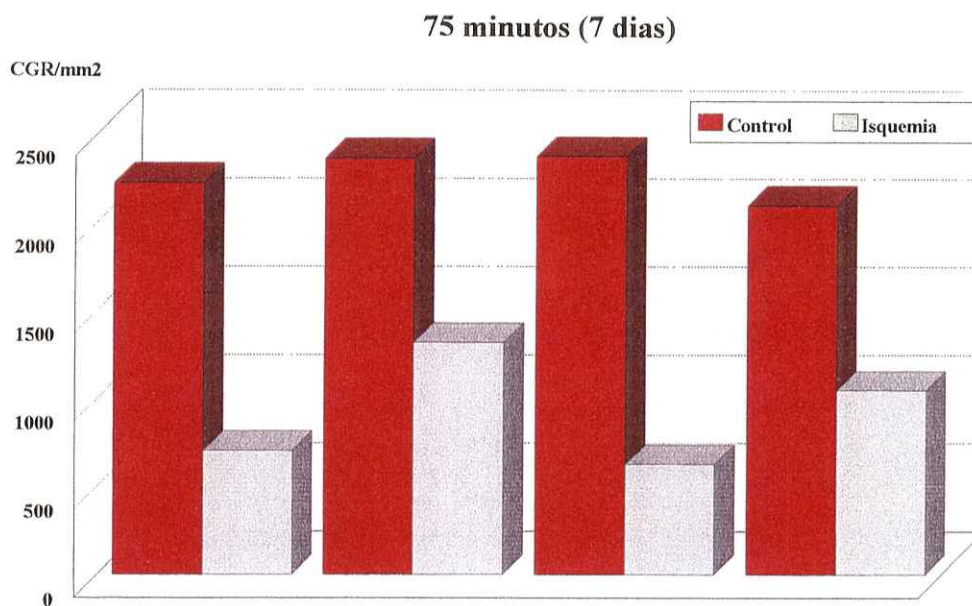
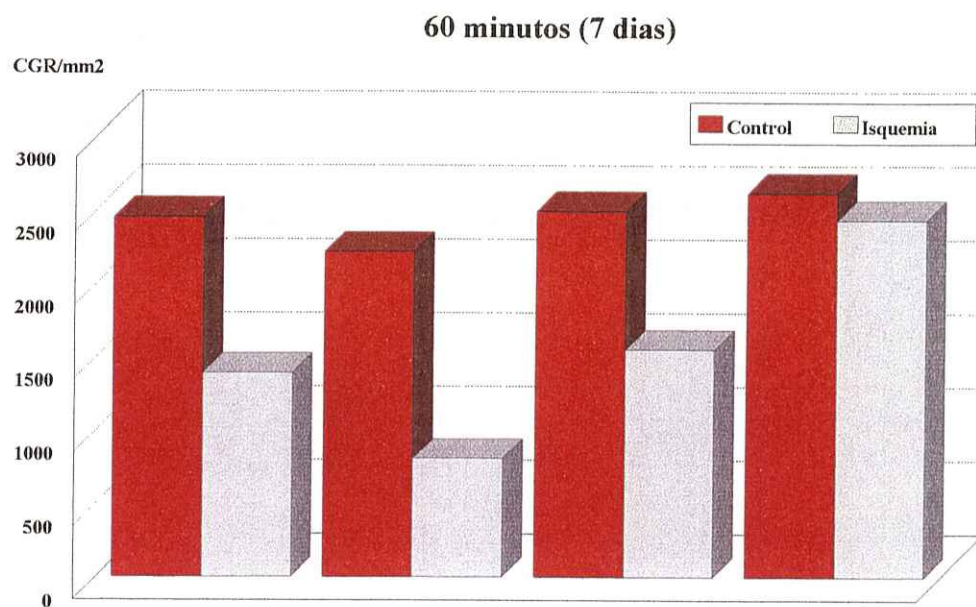


Fig. 22. Densidades medias de CGR marcadas con fluorogold en las retinas de animales del grupo C tras un intervalo de supervivencia de 7 días y periodos transitorios de isquemia de 60 minutos (superior) y 75 minutos (inferior). Cada par de barras representa la densidad obtenida en la retina control e isquémica de cada uno de los animales.

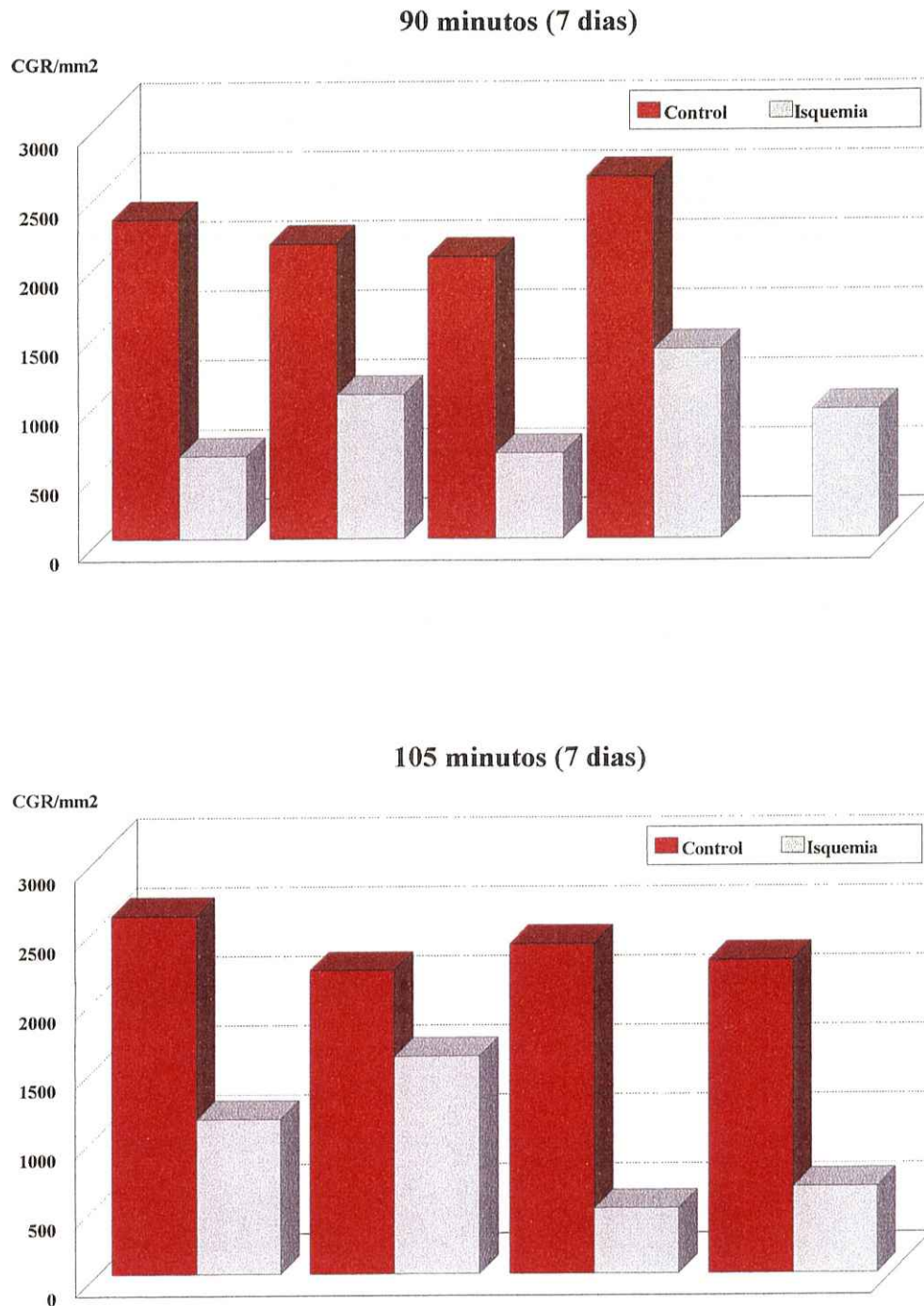


Fig. 23. Densidades medias de CGR marcadas con fluorogold en los animales del grupo C. tras un intervalo de supervivencia de 7 días y periodos transitorios de isquemia de 90 minutos (superior) y 105 minutos (inferior). Cada par de barras representa la densidad obtenida en la retina control e isquémica de cada uno de los animales.

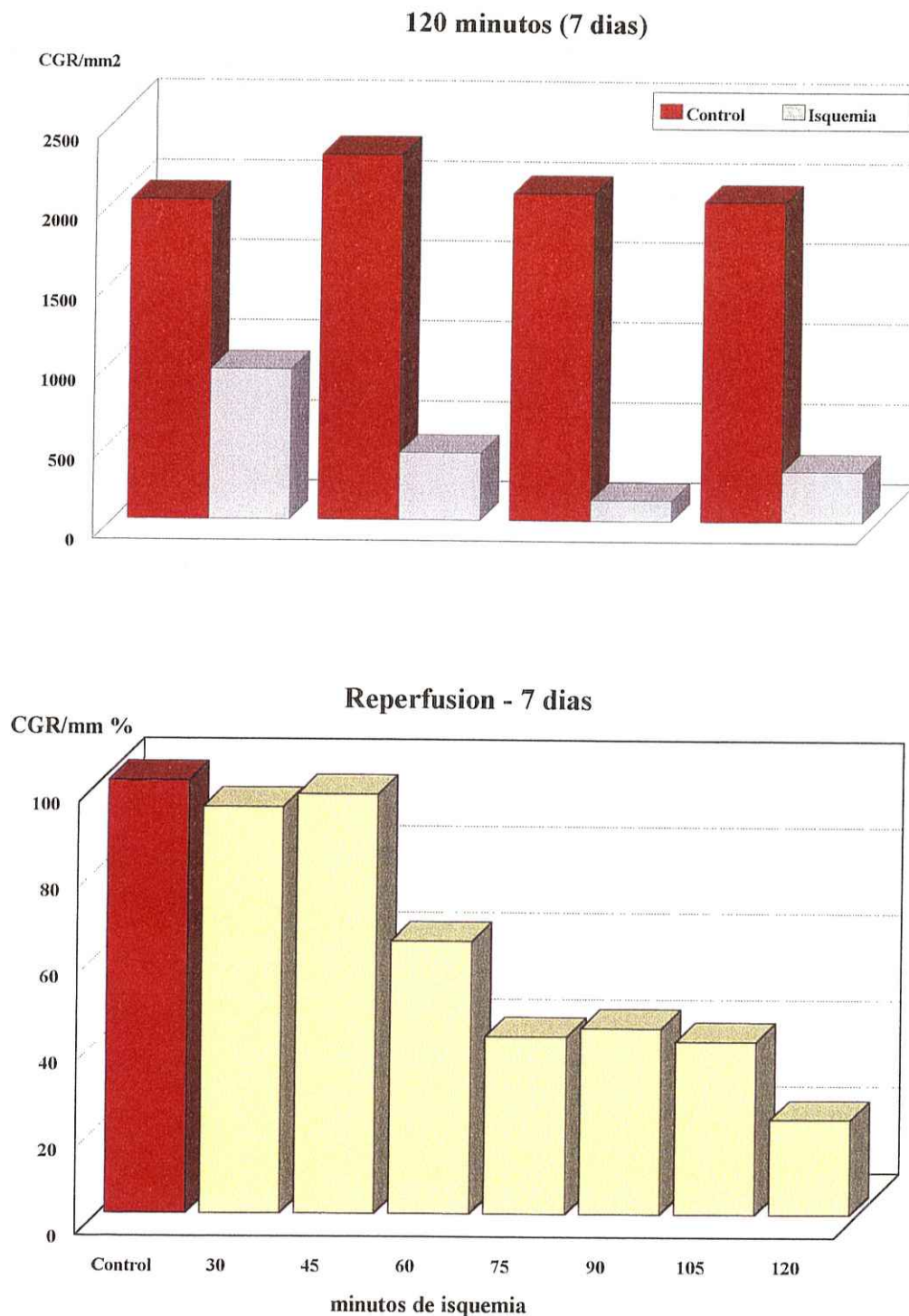


Fig. 24. En la parte superior se representan las densidades medias de CGR marcadas con fluorogold en animales del grupo C, tras un intervalo de supervivencia de 7 días y un periodo transitorio de isquemia de 120 minutos. Cada par de barras representa la densidad obtenida en la retina control e isquémica de cada uno de los animales analizados en este subgrupo.

En la parte inferior se representan las densidades medias expresadas en tanto por cien con respecto a las de sus controles para cada uno de los subgrupos analizados tras diferentes periodos de isquemia transitoria.

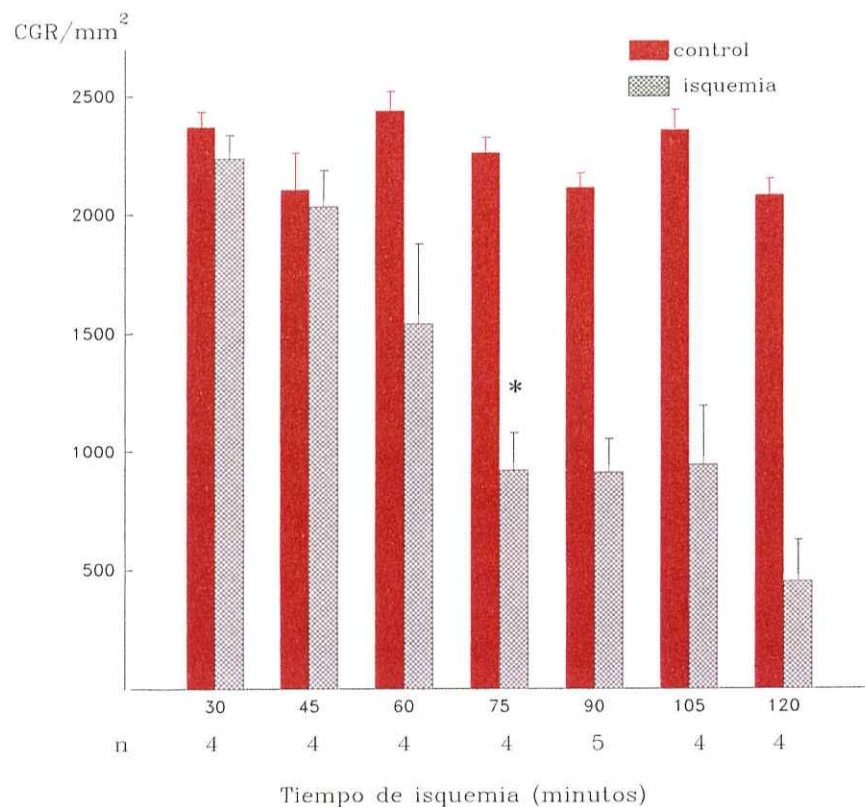


Fig. 25. Densidades medias \pm ESM de CGR marcadas con FG en retinas controles y experimentales, 7 días después de estar sometidas a de diferentes períodos de isquemia transitoria de 30, 45, 60, 75, 90, 105 y 120 minutos, respectivamente. En el eje de abscisas vienen representados los diferentes tiempos de isquemia y el número de animales examinados. (*) indica el período de isquemia tras el cual la reducción de la densidad CGR comienza a ser significativa en las retinas experimentales con ($P < 0,05$; Test de Mann-Whitney) respecto a las retinas control. Las densidades obtenidas tras períodos transitorios de isquemia de 75, 90 y 105 minutos no fueron diferentes entre sí, pero si lo fueron con los valores obtenidos tras períodos de isquemia de 120 minutos.

GRUPO D: Estimación de la densidad de (CGR/mm²) tras un periodo de supervivencia del animal de 5 días, transcurridos desde el momento que finalizó la isquemia (Figs.26, 27, 28, 29 y 30), (Tabla 6).

Las densidades medias de CGR marcadas con FG en las retinas sometidas a 30 y 45 minutos de isquemia fueron de 2174±85 y 2105±201, lo que representa el 92 y 97% respectivamente de CGR marcadas con FG con respecto a las retinas controles o derechas. El análisis estadístico de este grupo experimental es muy similar al obtenido para el Grupo C, y al igual que en el resto de grupos no se aprecian diferencias significativas con respecto a los controles para tiempos de isquemia de 30 y 45 minutos. Tras 60 minutos de isquemia transitoria estos valores fueron de 1550±169, lo que supone el 67% con respecto a la densidad media de las retinas contralaterales. No se apreciaron diferencias significativas entre los valores obtenidos para períodos de 30, 45 ó 60 minutos de isquemia.

Cuando el período de isquemia fue de 75 minutos el número medio de CGR/mm² en las retinas experimentales fue de 1325±69 mostrando diferencias estadísticamente significativas cuando se compararon con isquemias de 30 ó 45 minutos de duración (P<0.04; test Mann-Whitney). Cuando se compararon las densidades medias de CGR marcadas con FG obtenidas después de 60 y 75 minutos de isquemia no se observaron diferencias estadísticamente significativas.

La densidad media de CGR marcadas con FG en las retinas experimentales tras 90 minutos de isquemia fue de 1281±171. Los porcentajes de CGR marcadas con FG con respecto a las retinas controles fueron de 67, 57 y 52 % para tiempos de isquemia de 60, 75 y 90 minutos respectivamente. No se encontraron diferencias significativas entre si cuando se compararon los valores obtenidos en las retinas sometidas a 60, 75 ó 90 minutos de isquemia. Sólo tiempos de isquemia de 120 minutos con un número de CGR/mm² de



671±56 mostraba diferencias significativas con todos los grupos sometidos a tiempos de isquemia menores ($P < 0,03$; test de Mann-Whitney).

Es de destacar que en este grupo de animales procesados a los 5 días postisquemia, para tiempo de isquemia de 60 minutos o más, al examinar las retinas al microscopio de fluorescencia se observaba cierto grado de edema que dificultaba en ocasiones el enfoque de la capa de CGR, así como numerosos detritus o restos fluorescentes y presencia de algunas células de la microglia.

Tiempo de isquemia (minutos)	Ojo derecho (control)	Ojo izquierdo (experimental)
30	2311 2211 2658	2297 2010 2217
Media±ESM % Superv	2360±159	2174±85 92%
45	2470 1711 1971	2502 1844 1971
Media±ESM % Superv	2161±230	2105±201 97%
60	2244 1945 2517 2531 2174 2405	1168 1353 1967 1197 1464 2153
Media±ESM % Superv	2302±92	1550±169 67%
75	2154 2290 2190 2473 2557	1489 1229 1499 1179 1230
Media±ESM % Superv	2332±79	1325±69(*) 57%
90	2134 2477 2184 2599 2854	1052 883 1234 1351 1889
Media±ESM % Superv	2449±133	1281±171(*) 52%
120	2610 2433 2361 2339	521 732 778 652
Media±ESM % Superv	2435±61	671±56(*) 27%

Tabla(6) : Datos obtenidos en el Grupo D (5 días reperusión postisquemia). (*) muestra la valoración estadística que ha sido significativa entre retinas experimentales y sus controles. Test de Mann-Whitney (P<0,05)

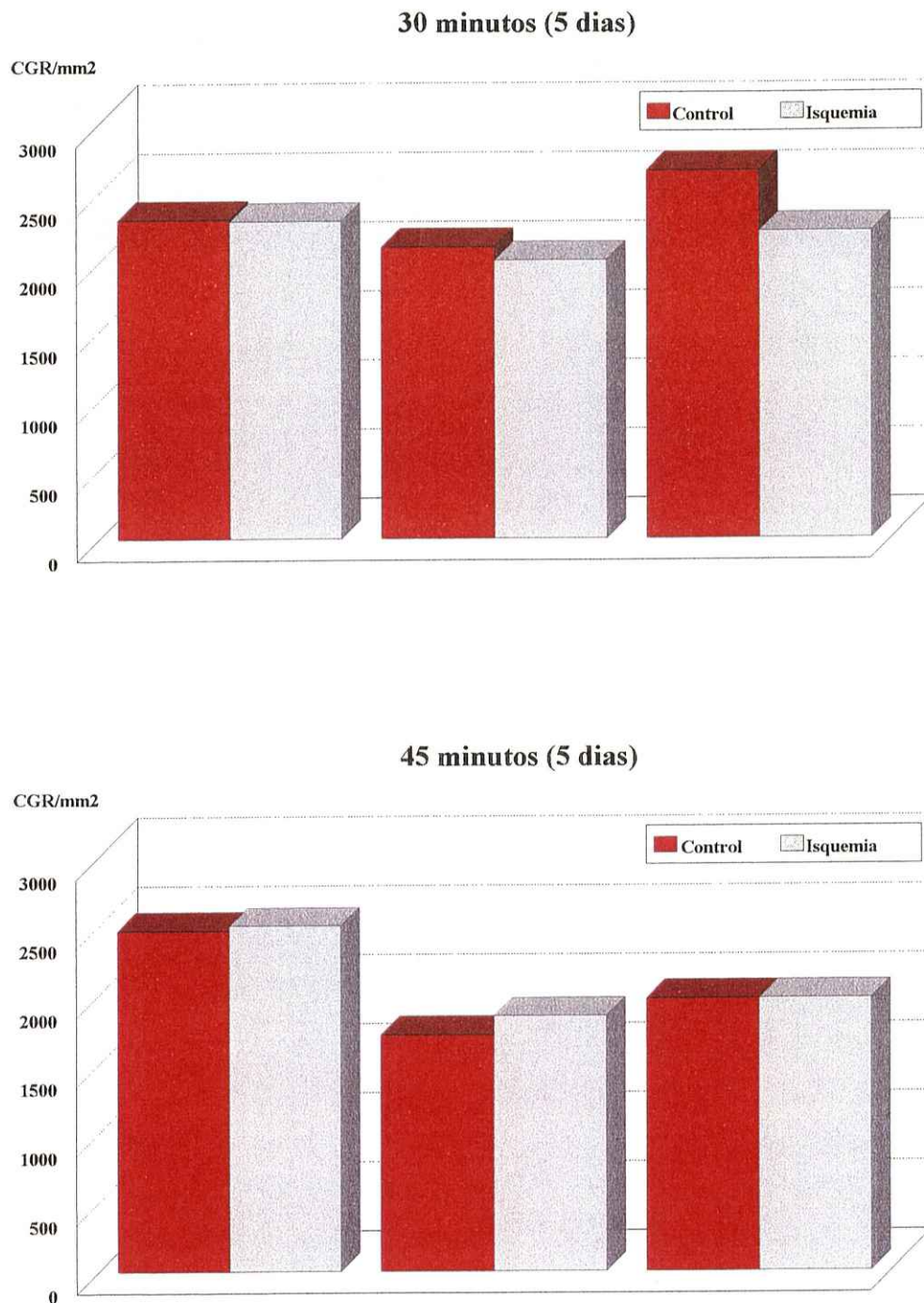


Fig. 26. Densidades medias de CGR marcadas con fluorogold en animales del grupo D tras un intervalo de supervivencia de 5 días y períodos transitorios de isquemia de 30 minutos (superior) y 45 minutos (inferior). Cada par de barras representa la densidad obtenida en la retina control e isquémica de cada uno de los animales.

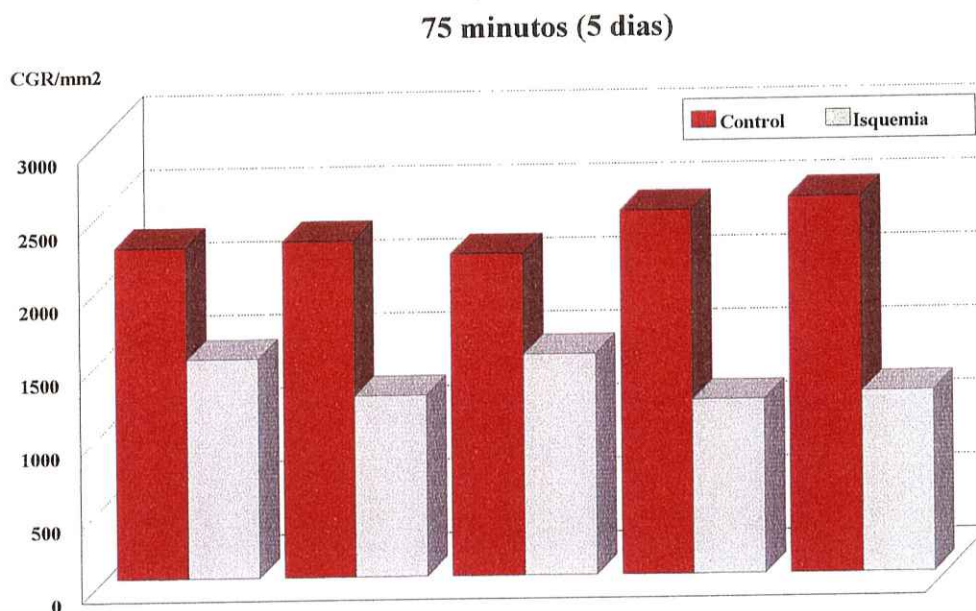
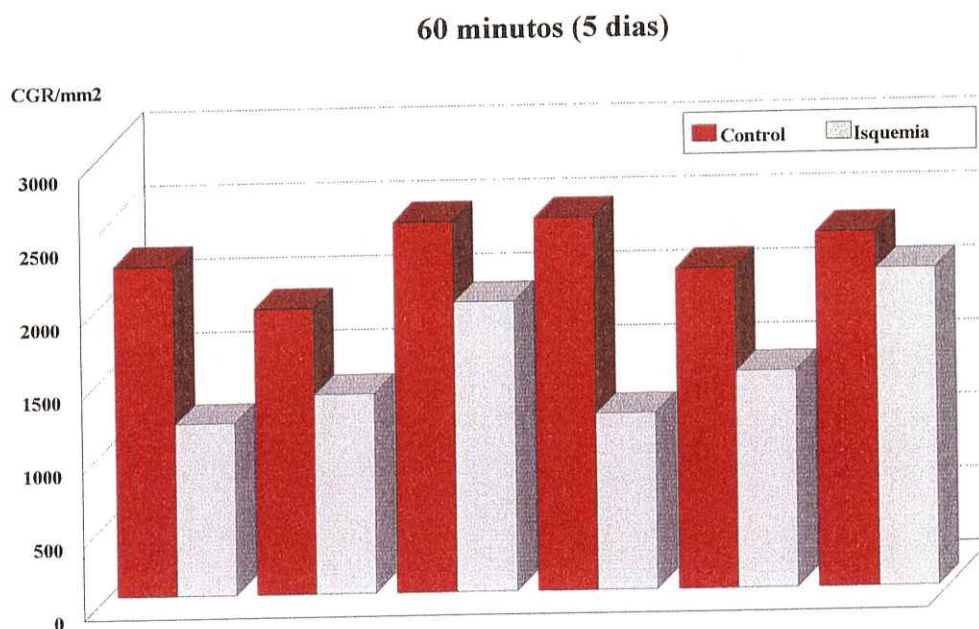


Fig. 27. Densidades medias de CGR marcadas con fluorogold en retinas de animales del grupo D tras un intervalo de supervivencia de 5 días y períodos transitorios de isquemia de 60 minutos (superior) y 75 minutos (inferior). Cada par de barras representa las densidades obtenidas en las retina control e isquémica de cada uno de los animales.

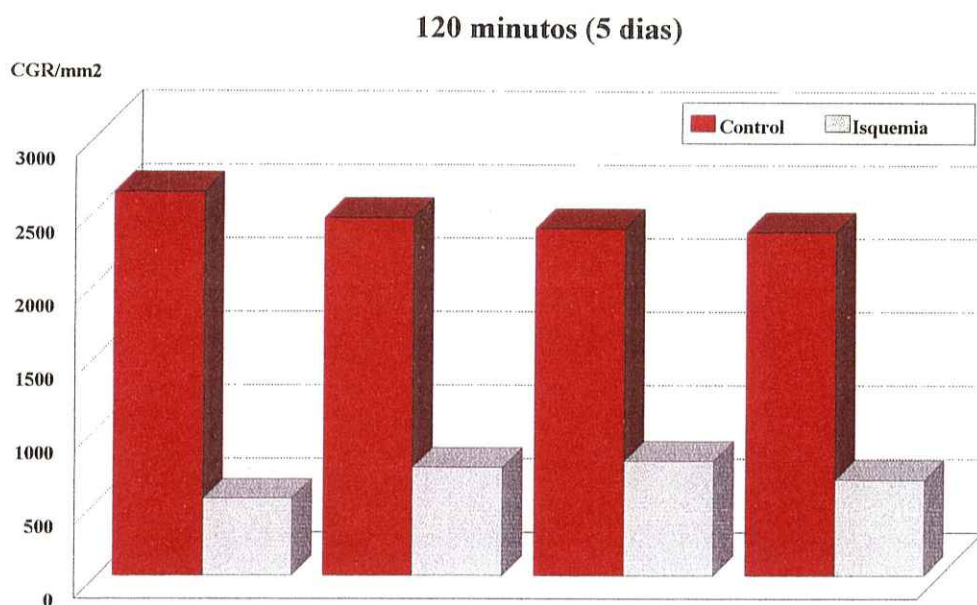
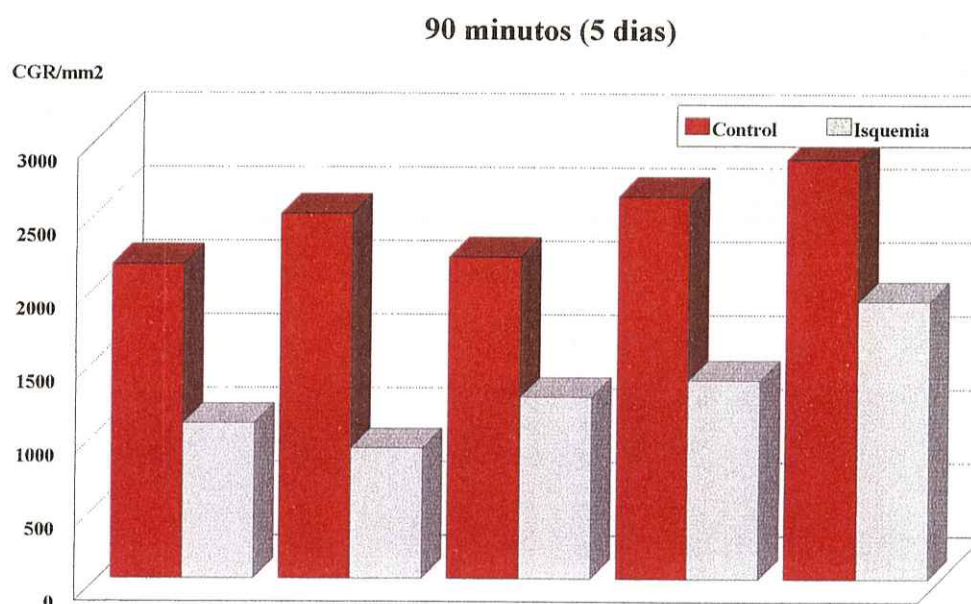


Fig. 28. Densidades medias de CGR marcadas con fluorogold en las retinas de los animales del grupo D, tras un intervalo de supervivencia de 5 días y periodos transitorios de isquemia de 90 minutos (superior) y 120 minutos (inferior). Cada par de barras representa las densidades obtenidas en las retinas control e isquémica de cada uno de los animales.

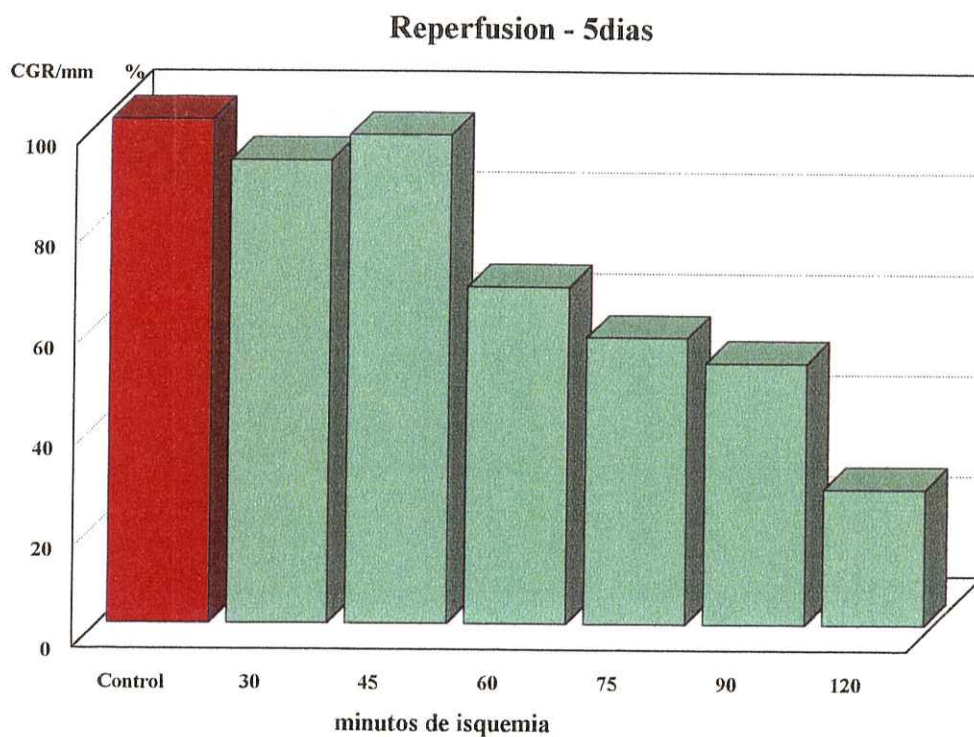


Fig. 29. Histograma de barras que representa las densidades medias obtenidas en retinas experimentales expresadas en tanto por cien con respecto a las de sus controles para cada uno de los subgrupos analizados del grupo D que fueron analizados a los 5 días de diferentes períodos de isquemia transitoria.

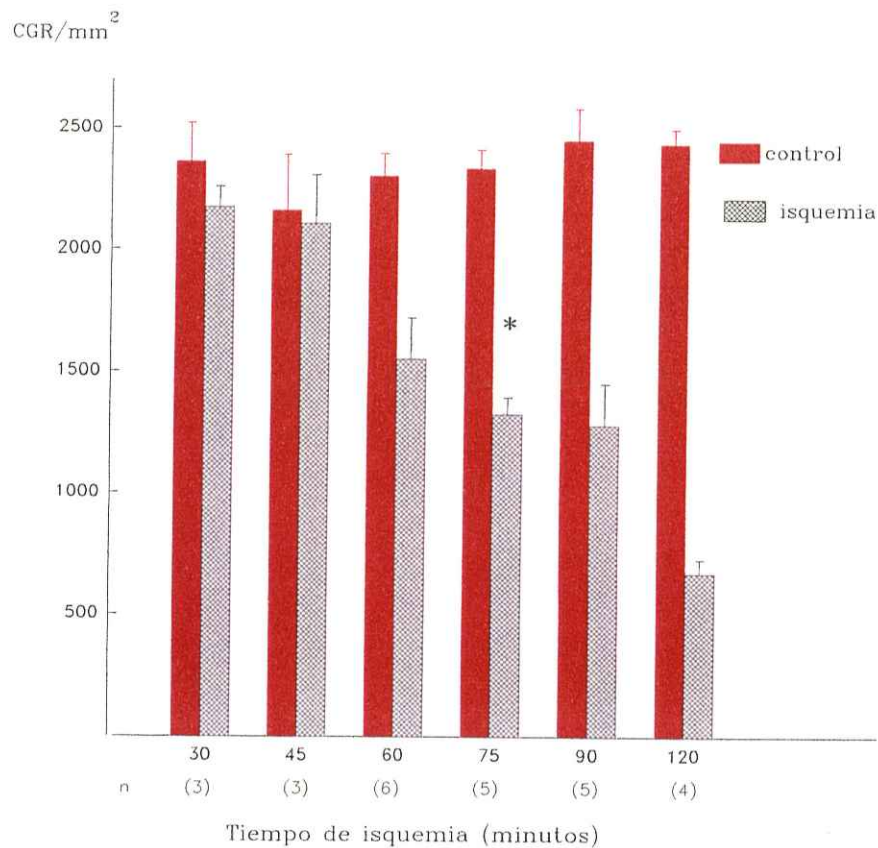


Fig. 30. Densidades medias \pm ESM de CGR marcadas con FG en retinas controles y experimentales de animales del grupo D, procesados 5 días después de periodos de isquemia transitoria de 30, 45, 60, 75, 90 y 120 minutos, respectivamente. En el eje de abscisas vienen representados los diferentes tiempos de isquemia y el número de animales examinados en cada uno de ellos. (*) indica el período de isquemia en el que la reducción del número de CGR comienza a ser significativo ($P < 0,05$; test de Mann-Whitney).

4.4. SUPERVIVENCIA DE LAS CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA TRAS DIVERSOS INTERVALOS DE REPERFUSIÓN.

Los datos obtenidos en cada uno de los grupos experimentales descritos en el apartado anterior se analizaron estadísticamente para determinar si para un mismo tiempo de isquemia transitoria que inducía un porcentaje de muerte neuronal en la población de CGR, la proporción de CGR que morían se incrementaba con el tiempo. Es decir, en otras palabras, ¿tiene algún efecto el intervalo de supervivencia o reperfusión en la muerte de las CGR tras la isuemia?. A este fín, se compararon estadísticamente las densidades medias obtenidas en retinas sometidas a idénticos tiempos transitorios de isquemia pero analizadas tras diferentes intervalos de reperfusión (5, 7, 14 y 30). Nos interesó en particular analizar aquellos tiempos de isuemia que inducían muerte neuronal, a saber: 60, 75, 90, 105 ó 120 minutos.

Las densidades celulares obsevas en las retinas analizadas 30 días tras la isquemia no se utilizaron para realizar comparaciones estadísticas ya que se observó que el número de células marcadas decrecía de forma significativa en las retinas controles ente 14 y 30 días tras la isquemia, lo que nos indicaba que las células perdían FG o lo metabolizaban, o bien este marcador perdía su fluorescencia. Por ello, sólo hemos realizado comparacioens estadísticas entre las densidades obtenidas 5, 7 y 14 días tras la isquemia.

Para períodos de isquemia transitoria de 60 minutos, el porcentaje de supervivencia de CGR en las retinas experimentales con respecto a las contralaterales o controles, fue de 67, 63, 51 y 45%, respectivamente, cuando se analizaron a los 5, 7, 14 y 30 días, respectivamente, después de la isquemia. No se observaron diferencias significativas entre las densidades obtenidas para los grupos de animales analizados a los 5, 7 y 14 días.



Para períodos de isquemia transitoria de 75 minutos, la comparación estadística de las densidades obtenidas tras 5, 7 y 14 días de reperfusión indicaba que existían diferencias significativas entre 5 y 14 días ($p < 0,008$) (Fig.33) y entre 7 y 14 días ($p < 0,02$ Fig.34). En estos experimentos, el porcentaje de supervivencia de CGR en las retinas experimentales con respecto a las contralaterales o controles, fue de 57, 41, 18 y 24%, cuando se analizaron a los 5, 7, 14 y 30 días, respectivamente tras la isuemia. Estos resultados revelan que tras un período transitorio de isquemia de 75 minutos, la población de CGR supervivientes disminuye entre los días 5 y 14 tras la isquemia.

Para períodos de isquemia transitoria de 90 minutos, la comparación de las densidades obtenidas tras 5, 7 y 14 días de reperfusión indicaba que existían diferencias significativas entre 5 y 14 días ($p < 0,02$) (Fig.33) y entre 7 y 14 días ($p < 0,02$) (Fig. 34). En estos experimentos, el porcentaje de supervivencia de CGR en retinas experimentales con respecto a las contralaterales fue de 52, 43, 16 y 4%, respectivamente, cuando se analizaron a los 5, 7, 14 y 30 días, respectivamente. Estos resultados revelan también que tras un período transitorio de isquemia de 90 minutos, la población de CGR supervivientes disminuye entre los días 5 y 14 tras la isquemia, y sugiere que este proceso de muerte de CGR prosigue durante las dos semanas siguientes, es decir hasta el día 30 tras la lesión.

Para períodos de isquemia transitoria de 105 minutos, la comparación de las densidades obtenidas tras 5, 7, y 14 días de reperfusión indicaba que existían diferencias significativas entre 7 y 14 días ($P < 0,03$) (fig.34). En estos experimentos, el porcentaje de supervivencia de CGR en retinas experimentales con respecto a las contralaterales fué de 40, 13 y 8%, cuando se analizaron a los 7, 14 y 30 días, respectivamente. Estos resultados documentan también por primera vez, que tras un período transitorio de isquemia de 105 minutos, la

población de CGR supervivientes disminuye entre los días 7 y 14 tras la isquemia, y sugiere que este proceso de muerte de CGR prosigue durante las dos semanas siguientes, es decir hasta el día 30 tras la lesión.

Para períodos de isquemia transitoria de 120 minutos, la comparación de las densidades obtenidas tras 5, 7 y 14 días de reperfusión indicaba que existían diferencias significativas entre 5 y 14 días ($p < 0,02$) (Fig.34). En estos experimentos, el porcentaje de supervivencia de CGR en retinas experimentales con respecto a las contralaterales fué de 27, 22, 9 y 5%, cuando se analizaron a los 5, 7, 14 y 30 días, respectivamente. Estos resultados revelan también por primera vez, que tras un período transitorio de isquemia de 120 minutos, la población de CGR supervivientes disminuye entre los días 5 y 14 tras la isquemia, y sugiere que este proceso de muerte de CGR prosigue durante las dos semanas siguientes, es decir hasta el día 30 tras la lesión.

En base a los valores expresados como porcentajes se ha elaborado el histograma de la Fig. 35, que refleja el patrón de muerte neuronal en la población de CGR sometidas a períodos transitorios de isquemia a lo largo del tiempo. Se han obtenido los valores de supervivencia comparando las densidades medias de las retinas izquierdas con las derechas o controles para cada subgrupo de animales para un mismo tiempo de reperfusión, ya que ambos ojos de un mismo animal están sometidos a la misma probabilidad de pérdida dl FG. A la vez hemos comparado el porcentaje de supervivencia entre los diferentes grupos (A, B, C, y D). Esta aproximación sí que nos permite una interpretación de los resultados, al margen del defecto mostrado por el FG.

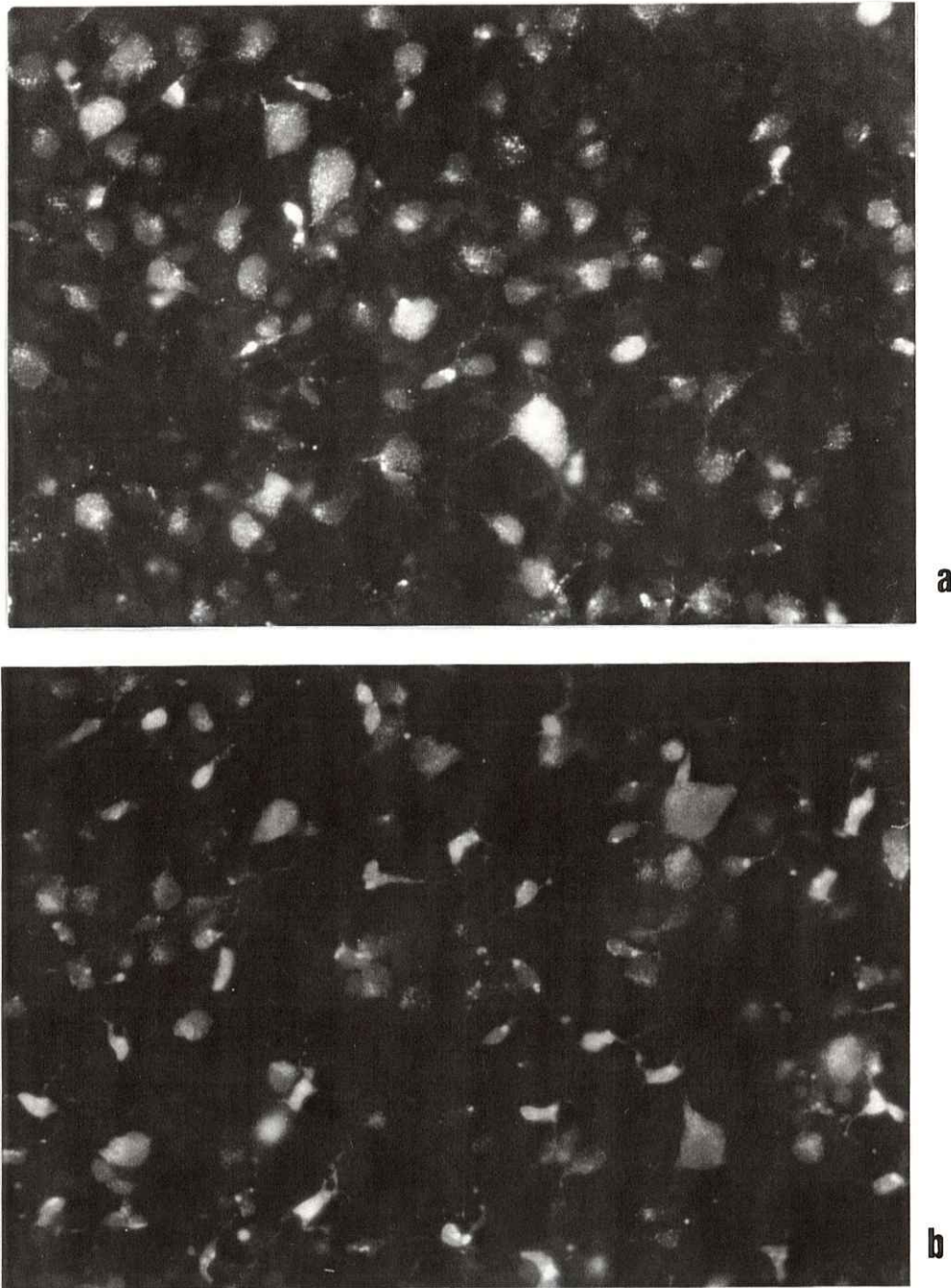


Fig. 31. Fotografías ($\times 342$) representativas tomadas al microscopio de fluorescencia en la capa de CGR de retinas sometidas a un tiempo de isquemia de 90 minutos pero a diferentes intervalos de supervivencia de 5 (a) ó 7 (b) días tras la isquemia.

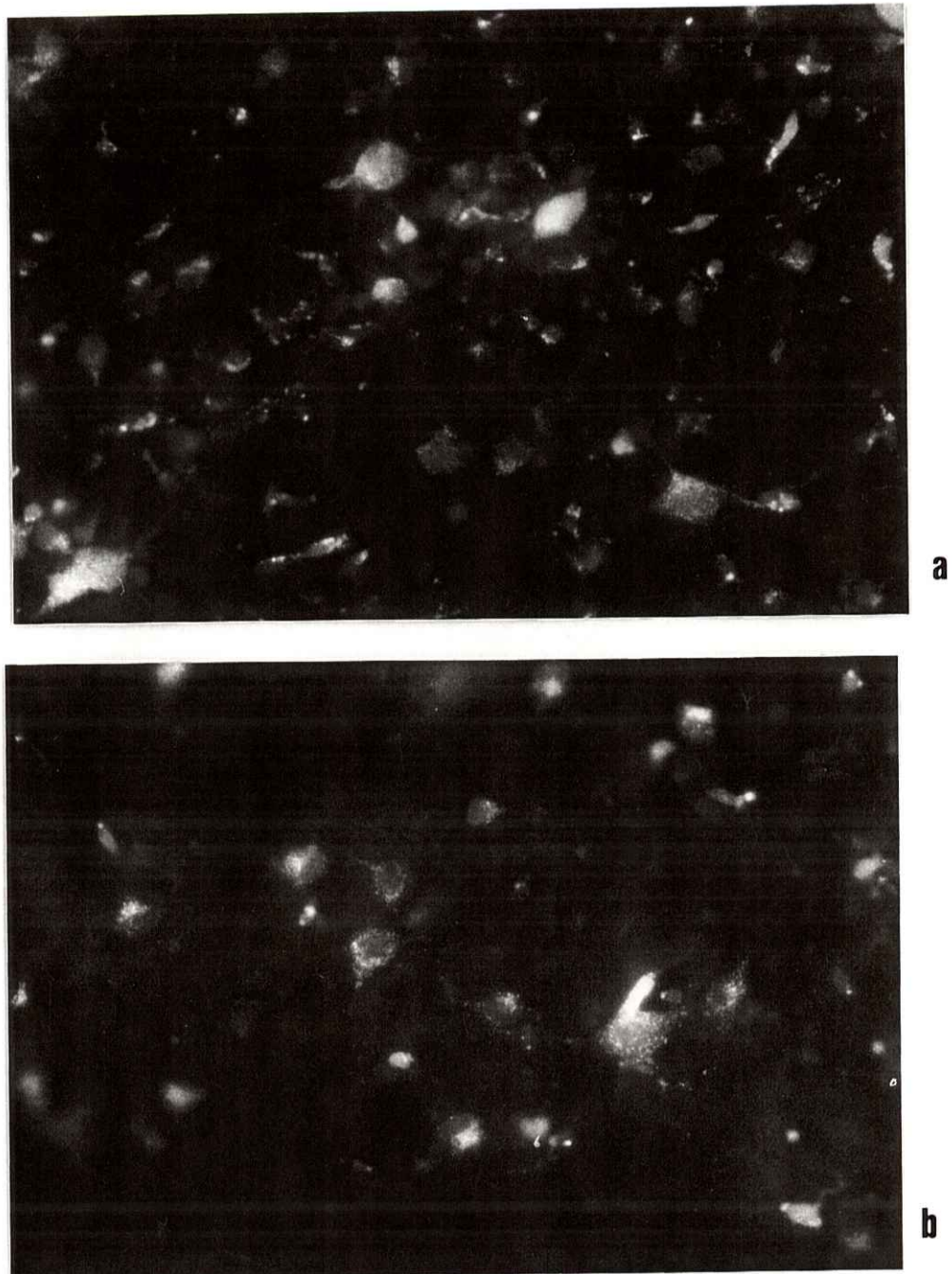


Fig. 32. Fotografías ($\times 342$) representativas tomadas al microscopio de fluorescencia en la capa de CGR de retinas sometidas a un mismo tiempo de isquemia transitoria (90 minutos) pero analizadas tras intervalos de supervivencia de 14 (a) ó 30 (b) días tras la isquemia.

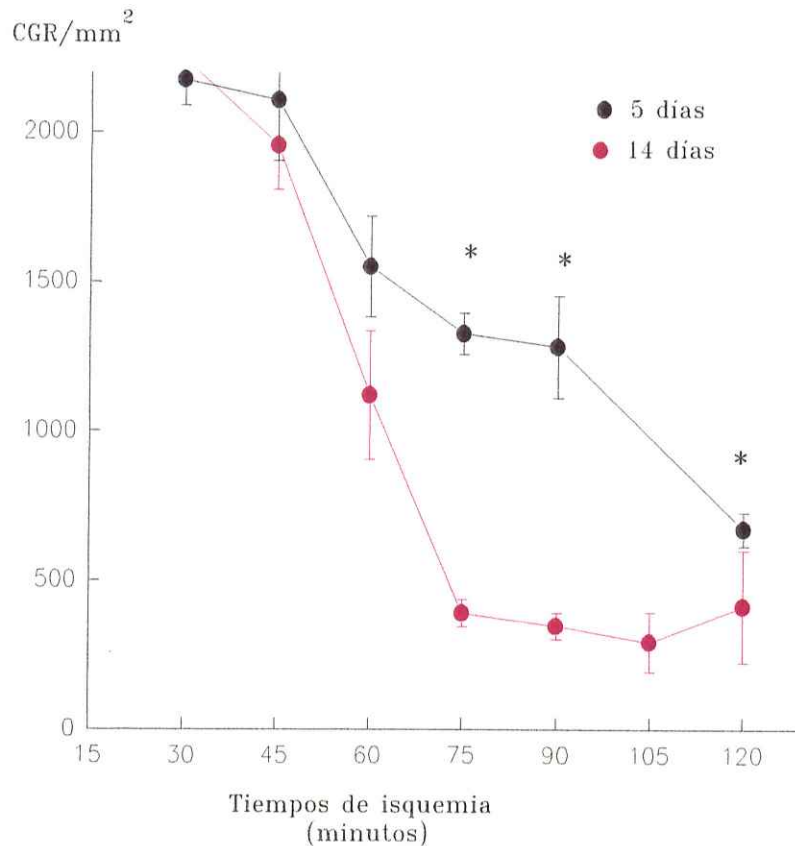


Fig. 33. Representación gráfica de la media de CGR/mm² (\pm ESM) obtenida para los diferentes periodos de isquemia transitoria en las retinas experimentales analizadas a los 5 y 14 días. Para idénticos periodos de isquemia transitoria se aprecian reducciones significativas de las densidades (* $P < 0,02$), cuando el intervalo de supervivencia del animal se incrementa de 5 a 14 días.

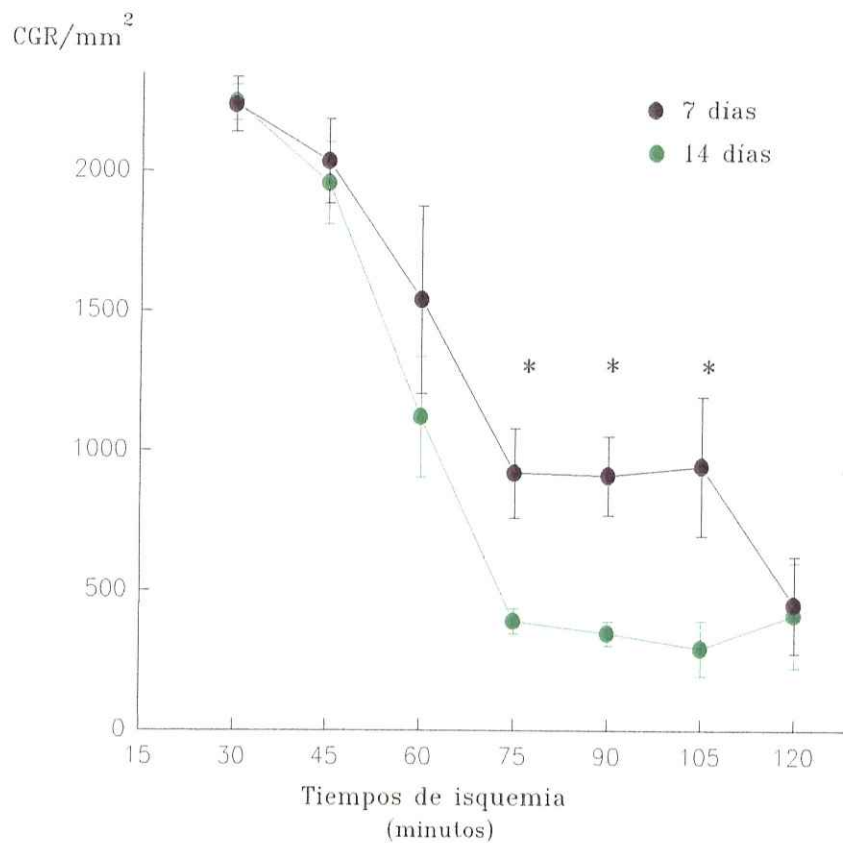


Fig. 34. Representación gráfica de la media de CGR/mm² (\pm ESM) obtenida para los diferentes periodos de isquemia transitoria en las retinas experimentales analizadas a los 7 y 14 días. Para idénticos periodos de isquemia transitoria se aprecian reducciones significativas de las densidades (* $P < 0,03$), cuando el intervalo de supervivencia del animal se incrementa de 5 a 14 días.

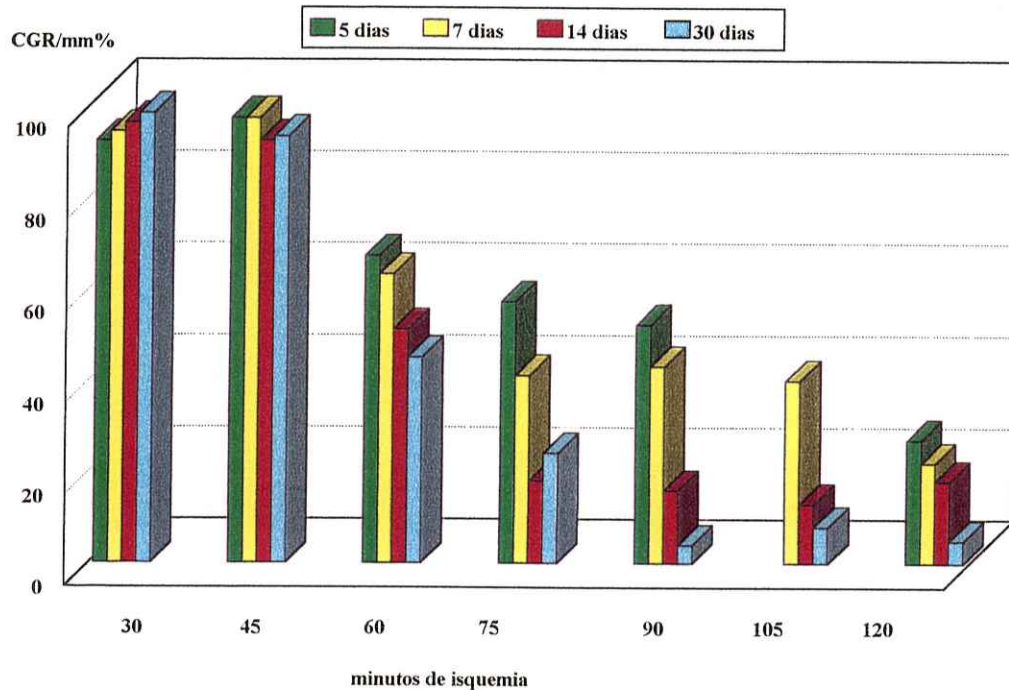


Fig. 35. Histograma de barras en el que se representa, en porcentaje respecto a sus controles, la supervivencia de CGR obtenida en los diferentes grupos de retinas analizadas a los 5, 7, 14 y 30 días, respectivamente, tras períodos de isquemia transitoria de 30, 45, 60, 75, 90, 105 y 120 minutos. Para cada período de isquemia transitoria, se representan los porcentajes de supervivencia obtenidos tras diferentes intervalos de reperusión. Para periodos de isquemia transitoria superiores a 45 minutos, se puede apreciar la disminución progresiva en la supervivencia de CGR a medida que incrementa el intervalo de supervivencia del animal.

4.5. SUPERVIVENCIA DE LAS CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA TRAS LIGADURA SELECTIVA DE LA ARTERIA OFTÁLMICA: RESULTADOS PRELIMINARES.

GRUPO F, I: Estimación de las densidades de CGR (CGR/mm²) tras un intervalo de supervivencia del animal de 30 días, transcurridos desde el período de isquemia transitoria de 90 minutos.

La observación microscópica de la capa de las CGR mostraba un aspecto similar a las descritas en el Grupo A para este tiempo de isquemia. Las CGR marcadas con FG se apreciaban con nitidez, y también se apreciaban células de la microglia teñidas con FG.

En los 4 animales examinados, la densidad media de CGR marcadas con FG en las retinas experimentales fue de 816 ± 234 , que corresponde al 32% de las densidades de CGR marcadas con FG en las retinas contralaterales o controles. Cuando se compararon con las densidades medias obtenidas en las retinas experimentales y control se observaron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,04$; test de Mann-Whitney).

Cuando este grupo experimental, en el que se produjo una oclusión vascular selectiva de la arteria y vena oftálmicas, se comparó con el correspondiente subgrupo de animales del grupo A (analizados a los 30 días) sometido a 90 minutos de isquemia transitoria, se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,02$, test de Mann-Whitney). Esto indica que a los 30 días, el porcentaje de muerte de CGR difiere según se haya inducido la isuemia por oclusión vascular selectiva ó por aumento de la presión intraocular.

GRUPO F, II: Estimación de las densidades de CGR (CGR/mm²) tras un período de isquemia transitoria de 90 minutos y intervalo de supervivencia de 7 días.

La capa de las CGR mostraba a la microscopía un aspecto similar a las descritas en el Grupo A para este tiempo de isquemia. Las CGR marcadas con FG se apreciaban con nitidez y se apreciaban escasas células de la microglia teñidas con FG.

En los 7 animales examinados, la densidad media de CGR marcadas con FG en las retinas experimentales fue de 1351 ± 559 , lo que corresponde al 46% de las densidades de CGR marcadas con FG en las retinas contralaterales o controles. Cuando se compararon con las densidades medias obtenidas en las retinas experimentales y control se observaron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,02$; test de Mann-Whitney).

Como hemos visto, en este grupo experimental el porcentaje de supervivencia respecto a las retinas contralaterales fue del 46%. En el subgrupo de animales correspondiente al grupo C (analizados a los 7 días) sometido a 90 minutos de isquemia transitoria, este porcentaje era similar, del 43%. Cuando estos grupos experimentales, se compararon estadísticamente, no se observaron diferencias significativas. Esto indica que a los 7 días, la muerte de CGR es similar, independientemente de que la isquemia se haya inducido por oclusión vascular selectiva ó por aumento de la presión intraocular.

Para analizar si en el grupo F, se observaba también una progresión a lo largo del tiempo en la muerte de las CGR (entre 7 y 30 días) o si la muerte ocurría en los primeros días, sin modificación posterior, comparamos entre sí los resultados obtenidos a los 7 y 30 días. Este análisis no reflejaba diferencias estadísticamente significativas. Sugiere que la isquemia retiniana inducida por

clampaje selectivo de la arteria y vena oftálmicas, producía una muerte inicial brusca, similar a la observada con el otro método, que no progresaba en el tiempo. Sin embargo el escaso número de animales analizado y en sólo dos períodos de supervivencia no permite ahondar más en este tema.

Efectos de diferentes métodos de inducción de isquemia retiniana en la supervivencia de las células ganglionares de la retina.

Intervalo de supervivencia	Isquemia inducida por ligadura de la arteria y vena oftálmicas		Isquemia inducida por aumento de la presión intraocular	
	Retina izquierda	Retina derecha	Retina izquierda	Retina derecha
7 días	786	3010	598	2306
	812	2671	616	2034
	1013	2440	928	---
	1070	2837	1041	2126
	1706	3260	1365	2608
	1978	2840		
	2095	3626		
media±ESM	1351±211* [@]	2954±391	909±142* [@]	2113±60
Supervivencia %	46%		43%	
n=	7	7	5	4
30 días	498	2837	33	1465
	780	2865	41	1871
	989	2300	59	2098
	998	2374	110	2003
			120	1523
media±ESM	816±234* [#] [@]	2594±298	73±18* [#]	1792±123
Supervivencia %	32%		4%	
n=	4	4	5	5

TABLA (8): Densidades de CGR/mm² marcadas con FG, 7 y 30 días después de isquemia transitoria de 90 minutos, inducida por oclusión vascular o por aumento de la presión intraocular.

*Diferencias significativas respecto a sus controles. Test de Mann-Whitney (p<0.05)

Diferencias significativas. Test de Mann-Whitney (p<0.02)

@ No existen diferencias significativas entre estos grupos. Test de Kruskal-Wallis.



DISCUSIÓN

5.- *DISCUSIÓN*

1. La retina como modelo para el estudio de la muerte neuronal inducida por la isquemia transitoria.
2. Modelo de incremento de la presión intraocular para inducir isquemia transitoria de la retina
3. Uso del fluorogold para identificar las células ganglionares de la retina.
4. Marcaje con fluorogold en retinas control y experimentales
5. Persistencia del fluorogold
6. Isquemia transitoria inducida por aumento de la pio: Muerte de las CGR
7. Isquemia transitoria inducida por ligadura selectiva de la arteria oftálmica: Muerte de las CGR
8. Posible aplicabilidad de los resultados obtenidos en nuestros estudios: Implicaciones clínicas.



La estrategia experimental utilizada en los experimentos descritos en esta Tesis, que ha consistido fundamentalmente en el uso combinado de técnicas de trazado neuronal y técnicas de inducción de isquemia transitoria mediante elevación de la presión intraocular, nos ha permitido efectuar estimaciones cuantitativas de la pérdida neuronal que sucede a períodos transitorios de isquemia en una parte del sistema nervioso central del mamífero adulto, la retina. Este estudio documenta que períodos transitorios de isquemia completa de la retina superiores a 45 minutos conducen a la muerte de un porcentaje de células ganglionares de la retina. Esta muerte de CGR inducida por la isquemia de la retina se ve influenciada directamente por la duración del período inicial de isquemia transitoria. Además, este estudio revela que la muerte de estas CGR isquemiadas se ve influenciada por la duración del intervalo de reperfusión o tiempo de supervivencia del animal de experimentación. Por último, en experimentos en los que hemos explorado el efecto del clampaje selectivo del paquete vascular oftálmico en la supervivencia de las CGR a lo largo del tiempo sugieren que la isquemia provocada por este método, induce muerte de las CGR que no se ve influenciada por la duración del intervalo de reperfusión o supervivencia del animal de experimentación. Estas aseveraciones se basan en análisis estadísticos y matemáticos de contajes de CGR marcadas retrógradamente con el trazador neuronal Fluorogold aplicado en los principales territorios retinorecipientes del cerebro, previamente a cualquier otra manipulación experimental.

5.1. LA RETINA COMO MODELO PARA EL ESTUDIO DE LA MUERTE NEURONAL INDUCIDA POR LA ISQUEMIA TRANSITORIA.

La retina de la rata adulta presenta varias ventajas para investigar con métodos cuantitativos los efectos de la isquemia en la supervivencia de las CGR,



a saber: i) La retina* es una extensión sensorial del sistema nervioso central que se encuentra aislada del resto del SNC, en el globo ocular, y que es fácilmente accesible a la manipulación experimental. ii) La arteria oftálmica en la rata acompaña al nervio óptico en su trayecto y penetra el globo ocular en la zona inferior y nasal del nervio óptico (Forrester and Peters, 1967; Janes and Bounds, 1955). Una vez dentro de la esclera, la arteria oftálmica da lugar a sus ramas terminales que proveen la vascularización del globo ocular, una de las cuales es la arteria central de la retina. La vena central de la retina a su salida del globo ocular se sitúa próxima a la arteria oftálmica, por lo que se puede realizar la disección cuidadosa de la arteria y vena, clampándolas selectivamente sin lesionar el nervio óptico. Por otra parte, como la retina se encuentra encapsulada en una estructura relativamente rígida, la esclerótica, un incremento en la presión intraocular puede interrumpir el flujo sanguíneo de la retina. Cualquiera de estos dos métodos permite producir experimentalmente un período de isquemia transitoria de la totalidad de las células ganglionares de la retina sin lesionar el nervio óptico u otras partes del cerebro y médula espinal, lo que permite estudiar la isquemia neuronal a corto y largo plazo. iii) Los territorios de proyección de las CGR en el mesencéfalo han sido bien definidos y la aplicación en éstos de trazadores neuronales, permite el marcaje y la identificación precisa de las CGR, y; iv) La retina puede disecarse y montarse in toto sobre un portaobjetos, de manera que en una sola preparación histológica podemos examinar la totalidad de la población de CGR.

* *".. una extensión periférica del sistema nervioso central, cuya delicadeza, transparencia y otras características estructurales la hacen especialmente apta para el análisis histológico..." (Ramón y Cajal, 1972. The structure of the retina. Charles C. Thomas. Springfield, Illinois, USA. pp.3-4.)*



Tiempo de isquemia minutos	Densidad CGR/mm ²	5 días	7 días	14 días	30 días
30	Media±ESM % Superv n	2174±85 92% 3	2235±98 94% 4	2243±63 96% 8	1808±61 98% 7
45	Media±ESM % Superv n	2105±201 97% 3	2033±151 97% 4	1956±146 92% 5	1866±120 93% 6
60	Media±ESM % Superv n	1550±169 67% 6	1539±335 63% 4	1119±215* 51% 8	826±159* 45% 7
75	Media±ESM % Superv n	1325±69*# 57% 5	919±160* 41% 4	391±45# 18% 6	426±89 24% 5
90	Media±ESM % Superv n	1281±171# 52% 5	910±142 43% 5	348±44# 16% 5	73±18 4% 5
105	Media±ESM % Superv n	---	944±249 40% 4	294±98 13% 4	147±62 8% 5
120	Media±ESM % Superv n	671±56# 27% 4	450±173 22% 4	413±188# 18% 6	100±21 5% 6

Tabla (8). Densidades medias ± ESM de células ganglionares marcadas con FG, de las retinas experimentales, sometidas a períodos de isquemia transitoria, analizados tras diferentes intervalos de supervivencia del animal.

Los * por columnas indica para qué tiempo de isquemia las diferencias comienzan a ser significativas con sus controles.

Los # y @ por filas, indican las diferencias estadísticamente significativas para períodos de isquemia similares e intervalos de supervivencia diferentes.



5.2. MODELO DE INCREMENTO DE LA PRESIÓN INTRAOCULAR PARA INDUCIR ISQUEMIA TRANSITORIA DE LA RETINA

Se han descrito muy diversas técnicas para inducir una isquemia experimental de la retina. Sin embargo, en todos los métodos es difícil determinar si el daño inducido se debe únicamente a la intensidad del insulto isquémico que puede oscilar entre una isquemia leve, moderada o grave, ser aguda o crónica, ó se debe también a causas adicionales como por ejemplo la alteración de la barrera hematoencefálica (Osborne y cols., 1995) o a otros factores como por ejemplo la compresión de los axones de las células ganglionares. El método experimental desarrollado para inducir la isquemia transitoria de la retina en estos estudios se ha basado en el incremento de la presión intraocular. Este método que presenta ciertas ventajas e inconvenientes.

Entre las ventajas de este método caben citar: i) El método desarrollado no invade estructuras intraoculares pues no se requiere canulación intraocular. Al no producir una punción intraocular en cámara anterior ni en cámara vítrea disminuimos el riesgo de infecciones intraoculares y también evitamos lesiones del cristalino, edema de córnea (Huges, 1992), hemorragias del iris o de la retina o desprendimientos de ésta. Por otra parte evitamos los efectos inflamatorios subsecuentes a la punción intraocular, que pueden desarrollar mecanismos inespecíficos de protección neuronal (Mansour-Robbaey y cols., 1994; Peinado, 1995) y que enmascararían los resultados y la interpretación de nuestros experimentos. ii) El método desarrollado es relativamente fácil de realizar y reproducible, como lo muestra la homogeneidad que en general hemos obtenido en los resultados de los diferentes grupos y subgrupos analizados. iii) Este método produce una interrupción total del flujo sanguíneo intraocular, tanto de la circulación retiniana como de la coroidea, permite visualizar el fondo de

ojo del animal y comprobar en todo momento la isquemia inducida así como la reinstauración del flujo vascular al finalizar el periodo de isquemia. iv) La simplicidad y economía de este método puede permitir en un futuro investigar la utilidad de diversas sustancias que se piensa que pueden proteger a la retina frente los efectos lesivos de la isquemia.

Este método experimental sin embargo no está exento de desventajas o limitaciones, como son: i) Este modelo no remeda la situación clínica de oclusión de la arteria central de la retina, ya que en esta situación con frecuencia no se altera la circulación coroidea y, las capas más externas de la retina no se ven afectadas. ii) Este método de inducción de isquemia transitoria parece ser de los más lesivos. En ratas adultas se utilizaron técnicas inmunocitoquímicas que detectan diferentes tipos y subtipos celulares de las capas internas de la retina para comparar el efecto que tenían diferentes métodos de inducción de isquemia de la retina (Osborne y cols., 1995). En estos experimentos tres procedimientos diferentes para inducir isquemia de la retina; la ligadura de ambas carótidas, la ligadura del nervio óptico y el aumento de la PIO, y se observó que el procedimiento más severo era el aumento de la PIO, y el menor la ligadura de ambas carótidas (Osborne y cols., 1995). iii) No podemos descartar que en este método experimental, además de la lesión causada por la isquemia, se hayan causado otros tipos de lesión de las CGR como, por ejemplo, una compresión de sus axones a nivel del disco óptico, ocasionando una interrupción del flujo axonal y mimetizando de esta manera los efectos de una axotomía (ver mas adelante).

5.3. USO DEL FLUOROGOLD PARA IDENTIFICAR LAS CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA.

La utilización de trazadores neuronales persistentes aplicados en los principales territorios retinorecipientes en el cerebro de la rata para marcar las CGR permite estudios cuantitativos in vivo de la supervivencia de estas células tras la axotomía en montajes globales (Vidal-Sanz y cols., 1988; Villegas-Pérez y cols., 1988, 1993; Vidal-Sanz y cols., 1993; Berkelaar y cols., 1994; Mansour-Robaey y cols., 1994; Peinado-Ramón y cols., 1995) Thanos, 1991; Thanos y cols., 1992, 1993; Berkelaar y cols., 1994; Mansour-Robaey y cols., 1994), y cortes radiales (Thanos y cols., 1992) de la retina.

El premarcaje de esta población celular, antes de cualquier otra manipulación experimental, es importante para distinguir las CGR de otras células y neuronas presentes en la capa de las ganglionares, como las células amacrinas. En la capa de las células ganglionares de la retina de la rata existe una población de células amacrinas desplazadas tan numerosa como la propia población de CGR (Perry and Cowey, 1979; Perry, 1981). A las dificultades técnicas para identificar las CGR con métodos anatómicos clásicos o inmunocitoquímicos habría que sumar las derivadas de las alteraciones que las CGR pueden sufrir en su tamaño, en la morfología de su árbol dendrítico y en definitiva en su fenotipo como consecuencia de la lesión (Thanos, 1988; Villegas-Pérez et al., 1988; McKerracher y cols., 1990a, b).

En el estudio actual, para identificar las CGR hemos utilizado el marcaje de las células ganglionares con un trazador neuronal fluorescente, una metodología previamente desarrollada (Vidal-Sanz y cols., 1988; Villegas-Pérez y cols., 1988, 1993; Vidal-Sanz y cols., 1993) y puesta a punto en el Laboratorio para la utilización del FG (Peinado-Ramón y cols., 1996; Sellés y cols., 1994,



1995). La aplicación del FG en ambos colículos superiores y cuerpos geniculados dorsolaterales permite identificar los somas de prácticamente la totalidad de las CGR por períodos de varias semanas (ver anteriormente). En los experimentos que nos ocupan hemos estimado las densidades de CGR marcadas con FG en 12 áreas estándar de la retina, situadas en los cuatro diferentes cuadrantes de la retina, y en un radio de 1-3 milímetros del disco óptico. Esto supone que se ha analizado la región central de la retina, pero no hemos contabilizado directamente la densidad celular en la región más periférica de la retina cuya densidad de CGR es menor (Fukuda, 1977; Schöber y Gruschka, 1977, Villegas-Pérez y cols., 1993). y cuya afectación tras isquemia transitoria de la retina también se ha sugerido que es menor (Hughes, 1991).

5.4. MARCAJE CON FLUOROGOLD EN RETINAS CONTROL Y EXPERIMENTALES

Al examinar las retinas al microscopio se observó la típica fluorescencia del FG en el citoplasma del soma e incluso a veces de las dendritas proximales de las CGR. Este marcaje con el FG, que era intenso, aparecía en los somas de las células tanto de forma homogénea como en forma puntiforme. La intensidad de la fluorescencia de las CGR no varió en las primeras semanas del estudio en las retinas controles. Sin embargo, en las retinas controles examinadas a los 3 meses se apreciaba subjetivamente una disminución en el número de CGR marcadas con FG.

Sin embargo, en las retinas experimentales sometidas a períodos de isquemia de 60 ó mas minutos se observaban otras células intensamente marcadas con FG que tenían un soma celular pequeño y procesos finos y tortuosos que se extendían a través de la capa de las CGR. Estas células, que se



distinguían claramente de las CGR, tenían la morfología típica de la microglía. La presencia de estas células microgliales marcadas con FG sugiere que en estas retinas experimentales se ha producido muerte neuronal. Las células de la microglía también se observaron marcadas con trazadores fluorescentes en estudios de muerte de CGR inducida por axotomía utilizando el FG (Peinado-Ramón y cols, 1995) y otro trazador fluorescente de la familia de las carbocianinas (Thanos, 1991; Villegas-Pérez y cols., 1993; Thanos y cols., 1992, 1993). En la retina de la rata adulta, se ha propuesto que las células microgliales fagocitan los detritus de las CGR que degeneran (Perry y cols., 1983) y al incorporar los detritus celulares fluorescentes se vuelven a su vez intensamente fluorescentes (Thanos, 1991; Thanos y cols., 1992, 1993). Este fenómeno de la fagocitosis de neuronas marcadas con FG se ha observado también recientemente en el sistema dopaminérgico nigro-estriatal, tras la muerte de neuronas dopaminérgicas inducida por la administración de 6-hidroxidopamina (Sauer y Oertel, 1994). Por otra parte, en estudios en paralelo realizados en el laboratorio (Peinado-Ramón y cols., 1996) se ha observado que a partir del 5º día tras la axotomía, coincidiendo con el momento en que empieza a producirse una muerte significativa en la retina, comienzan a apreciarse células de la microglía marcadas con FG en las retinas previamente marcadas con FG y axotomizadas. Cuando se examinaron secciones radiales obtenidas en el criostato de retinas axotomizadas, estas células de la microglía marcadas con FG aparecían siempre restringidas a la capa más interna de la retina (Vugler y Vidal-Sanz, observaciones no publicadas), corroborando que la fagocitosis de los detritus celulares se efectúa por células de la microglía y no por células de Müller que no aparecieron marcadas.

En las fotografías tomadas para estimar las densidades celulares, las células microgliales se pueden identificar por su fluorescencia uniforme e intensa, su pequeño cuerpo celular y sus procesos finos y tortuosos. Las CGR muestran



una fluorescencia menos intensa y puntiforme en el soma celular. Estos criterios para identificar las CGR permanecieron constantes a lo largo de todo el estudio, se hicieron sin conocer a priori el tipo de experimento que se examinaba y fueron efectuados todos por la autora de esta Tesis.

Estudios *in vivo* e *in vitro* efectuados por Dreyer y cols. (1994) indican que el tipo de CGR de gran tamaño es más sensible a la neurotoxicidad del glutamato, uno de los mecanismos excitotóxicos implicados en la lesión isquémica. En el presente estudio no hemos determinado qué subtipos celulares dentro de la población de CGR se verían mas afectados por la isquemia transitoria. Estudios previos indican que tras la lesión del nervio óptico, las CGR pueden disminuir de tamaño (Vidal-Sanz y cols., 1987; Villegas-Pérez, Vidal-Sanz, Bray and Aguayo, observaciones no publicadas) y muestran alteraciones morfológicas en sus árboles dendríticos que no permiten la identificación de los diversos tipos de CGR (Thanos, 1988). Un estudio detallado del tamaño de las CGR supervivientes requeriría nuevos experimentos en los que se utilizaran técnicas de inyección intracelular de marcadores que permitieran examinar con detalle la morfología de CGR lesionadas.

5.5. PERSISTENCIA DEL FLUOROGOLD

Los resultados obtenidos al analizar las densidades de CGR marcadas con FG en las retinas control, procesadas a los 12, 14, 21, 37 y 97 días de aplicar el trazador neuronal en ambos colículos superiores y cuerpos geniculados laterales, documentan una disminución de la densidad de CGR en retinas analizadas a los 37 días y a los 97 días de la aplicación del trazador. Cuando se compararon las densidades de CGR marcadas con FG entre las retinas analizadas a los 21 y a los 37 días de la aplicación del trazador, se observaron diferencias estadísticamente significativas que representaban aproximadamente una pérdida de marcaje de



aproximadamente el 10% de la población de las CGR. Asimismo se observaron diferencias significativas cuando se compararon las densidades de CGR marcadas con FG entre retinas analizadas a los 37 y a los 97 días de la aplicación del trazador. En este intervalo de tiempo, aproximadamente un 43% de la población de CGR perdía el marcaje con FG.

Estudiamos a continuación si las densidades de CGR marcadas con FG en las retinas controles se ajustaban a un modelo matemático lineal, basándonos en la premisa de que quizás el proceso de disminución de las densidades de células marcadas con FG se produjera de una forma uniforme con el tiempo. La ecuación que nos define el modelo lineal obtenido fué la siguiente: $Y = 23623.01 - 13.8623t$, donde Y es la densidad de células marcadas con FG en un momento determinado y t es el tiempo transcurrido desde la isquemia de la retina contralateral. El coeficiente de correlación o R^2 fué de 0.929. Este modelo matemático nos permite predecir el porcentaje de CGR que pierden el marcaje con FG a lo largo del tiempo y que es: i) entre 5 y 7 días del 1,2%; ii) entre 7 y 14 días del 4,3%; iii) entre 14 y 30 días del 10,2%; iv) entre 30 y 90 días del 42,7%. Con este modelo podemos predecir también que al cabo de 171 días la totalidad de las CGR habrían perdido el FG.

Esta disminución en el número de CGR marcadas con FG podría deberse, bien a una pérdida del marcaje, o también a una muerte de las células marcadas inducida por la neurotoxicidad del trazador. Experimentos realizados en otros grupos neuronales en el Laboratorio han descartado esta posibilidad (Gómez-Ramírez y cols., 1995), ya que han observado que si se vuelve a aplicar el marcador FG en el territorio de proyección neuronal cuando las neuronas han perdido la fluorescencia, las células vuelven a marcarse y la densidad de neuronas marcadas que se observa es similar a la densidad obtenida tras la primera aplicación del marcador. Otro hecho a favor de que no se produce



muerte neuronal sino pérdida del marcaje es que ni en estos experimentos ni en los de Gómez-Ramírez y cols. (1995) se han observado células de microglía marcadas con FG. Este hecho también nos indica que la pérdida del marcaje no se produce por una salida del FG hacia el medio extracelular, por lo que quizás pueda deberse bien a una pérdida de fluorescencia o bien a su metabolización por las células marcadas.

5.6. ISQUEMIA TRANSITORIA INDUCIDA POR AUMENTO DE LA PIO: MUERTE DE LAS CGR

5.6.1. Supervivencia de las CGR tras diferentes periodos de isquemia transitoria

5.6.1.1. Periodo de supervivencia de 30 días.

Para determinar los efectos de la isquemia transitoria sobre las CGR diseñamos un primer grupo de experimentos que se analizaron a los 30 días de la isquemia transitoria de la retina. Este primer grupo se analizó a los 30 días porque anticipábamos que este período de tiempo sería lo suficientemente largo como para permitir la eliminación de los detritus de las células que hubieran muerto tras el periodo de isquemia.

En este grupo observamos que las densidades medias de CGR marcadas con FG en las retinas experimentales o células supervivientes diferían substancialmente dependiendo del tiempo de isquemia. Así, las densidades de CGR marcadas con FG en retinas sometidas a periodos de isquemia de 30 o 45 minutos, eran similares a las obtenidas en las retinas contralaterales o controles, sugiriendo que estos tiempos de isquemia no producen una muerte de las CGR. Sin embargo cuando se analizaron las densidades de CGR en retinas sometidas



a periodos de isquemia de 60, 75 ó 90 minutos, a medida que aumentaba el tiempo de isquemia, se observaba una disminución significativa de las densidades de CGR marcadas con FG con respecto a sus controles. Estas observaciones indican que en la rata adulta, el tiempo de isquemia que induce daño irreversible, y por tanto muerte de las CGR, se sitúa entre 45 y 60 minutos.

Estudios previos semicuantitativos realizados en ratas, que han investigado las diferentes capas de la retina en secciones radiales de retinas sometidas a isquemias transitorias por aumento de la presión intraocular tras intervalos de supervivencia mucho mas cortos (Faberowski y cols., 1989; Hughes, 1991; Szabo y cols., 1991; Büchi y cols., 1992a; Büchi, 1992b), sugieren también la existencia de un período crítico tras el cual se produce muerte neuronal y que sitúan en 60 minutos de isquemia transitoria. En otro estudio (Hayreh y cols., 1980; Hayreh y Weingeistein 1980b) efectuado en 63 monos rhesus, en los que se induce isquemia transitoria por oclusión selectiva de la arteria central de la retina, y en el que emplearon técnicas de angiografía fluoresceínica, electrofisiológicas y morfológicas, se mostró que este período crítico se situaba entre 98 y 105 minutos. La diferencia entre estos estudios podría explicarse bien porque se realizaron en diferente animal experimental o bien porque las técnicas para la producción de la isquemia fueron diferentes.

En nuestro estudio, observamos que entre 60 y 90 minutos de isquemia transitoria se produce un gran aumento en el porcentaje de muerte de CGR. Además, tras 90 minutos de isquemia se observa la pérdida de aproximadamente el 95% de la población de CGR. Resulta, sin embargo, interesante que períodos de isquemia superiores a 90 minutos (105 y 120 minutos) no produzcan una pérdida adicional de células, sino que en estos grupos el porcentaje de muerte inducida sea similar a la que se observa a los 90 minutos. Es posible que la pequeña proporción de CGR supervivientes a largo plazo tras la isquemia



transitoria, que es de aproximadamente un 5%, tengan unos requisitos de supervivencia diferentes del resto de la población de células ganglionares de la retina. En otros experimentos en los que se seccionó el nervio óptico de la rata a su salida del ojo, se ha observado que un pequeño porcentaje de aproximadamente un 4% de la población de CGR sobreviven sin modificarse entre seis y 18 meses tras la lesión, por lo que se postuló que estas células supervivientes serían resistentes a la axotomía (Villegas-Pérez y cols., 1993). Resulta interesante comprobar que un porcentaje similar de CGR son resistentes a la isquemia retiniana y nos preguntamos si podría tratarse de las mismas células que podrían representar una subpoblación de CGR con unos requerimientos de supervivencia diferentes, que les permiten sobrevivir ante diferentes tipos de lesión.

5.6.1.2. Períodos de supervivencia de 14, 7, y 5 días

Para tratar de definir el curso de la muerte neuronal inducida por la isquemia en la población de CGR diseñamos tres grupos experimentales adicionales que examinamos a los 14, 7 y 5 días de haber sido sometidos a la isquemia. En estos tres grupos también observamos que, en general, las densidades medias de CGR marcadas con FG en las retinas experimentales diferían substancialmente dependiendo del período inicial de isquemia transitoria. Así, de manera similar a las observaciones del grupo A, analizado a los 30 días de la isquemia, las densidades de CGR marcadas con FG en retinas sometidas a isquemia transitoria de 30 y 45 minutos, eran similares a las obtenidas en las retinas contralaterales intactas o controles, sugiriendo que estos intervalos de isquemia no producen muerte de CGR. También se observó en estos grupos experimentales que se producían unas disminuciones de las densidades de CGR progresivas entre 60 y 90 minutos de isquemia en todos los grupos experimentales. Sin embargo existían diferencias entre los diferentes grupos, ya que para tiempos de isquemia similares, las pérdidas celulares eran menores



cuando los intervalos de supervivencia eran más cortos. Esto nos indicaba que la muerte de CGR inducida por la isquemia también variaba dependiendo del intervalo de reperfusión o de supervivencia del animal.

5.6.2. Efecto del intervalo de reperfusión en la muerte de las CGR

La muerte de las CGR en la rata ha sido objeto de múltiples estudios experimentales. Ocurre muerte de células ganglionares durante el desarrollo de la retina (Cunningham y cols., 1982, García Porrero y Ojeda, 1979; Kuwabara y Weidman, 1974, Penfold y Provis, 1986; Young, 1984) y también tras la lesión del nervio óptico, tanto intraorbitaria (Barron y cols., 1986; Villegas-Pérez y cols., 1988, 1993; Thanos, 1991; Mey y Thanos, 1992 Berkelaar y cols., 1994; Peinado-Ramón y cols., 199) como intracraneal (Villegas-Pérez y cols., 1993; Berkelaar y cols., 1994). Además, se ha descrito muerte neuronal en las capas nucleares externa e interna y en la capa de las CG tras isquemia reversible (Buchi, 1992a, 1992b) y tras isquemia irreversible (Kroll, 1968; Skai, 1969; Skabib y Ashton, 1966) de la retina.

El objetivo de esta tesis doctoral era el estudio cuantitativo de la muerte de las CGR tras diferentes intervalos de supervivencia ó reperfusión del animal. Pensamos que uno de los hallazgos originales y más relevantes de este estudio ha sido documentar que se produce una muerte progresiva de CGR entre 5 y 30 días después de la isquemia. Esta pérdida progresiva que sigue a una muerte inicial rápida, permite sugerir que tras la isquemia transitoria se produce una muerte abrupta o rápida y otra muerte más lenta, retrasada o dilatada en el tiempo cuyo desencadenante inicial es la isquemia pero cuyos mecanismos intrínsecos pueden ser diferentes.



5.6.2.1. Muerte inicial brusca de CGR inducida por isquemia transitoria

Cinco días después de provocar una isquemia transitoria de 60 minutos o más de duración hemos observado una pérdida substancial de CGR. Aunque no hemos estudiado que tipo de muerte neuronal se produce en nuestros experimentos, otros estudios previos sugieren que en la rata adulta, la muerte neuronal consecuenta a la isquemia inducida por aumento de la presión intraocular tiene características de necrosis y de apoptosis (Buchi, 1992). En un estudio semicuantitativo ultraestructural de la morfología de células de la retina efectuado entre 3 horas y 7 días después de isquemia reperusión, se observaron dos tipos diferentes de degeneración celular en la capa de las células ganglionares y en la capa nuclear interna. El tipo I se caracterizaba por una progresiva cario y citolisis (lisis del núcleo y de la totalidad de la célula) y es consistente con la necrosis, este tipo de muerte celular se observó con frecuencia en la capa de las CGR a las 3 y a las 24 horas de reperusión, aunque también se apreció esporádicamente hasta los 7 días de reperusión en la capa de las CGR y en la nuclear interna. El tipo II se caracterizó por la progresiva condensación y reducción del nucleoplasma y citoplasma seguidos de una fagocitosis y destrucción de los componentes celulares condensados por eliminación heterofágica, semejando la apoptosis; este tipo de muerte celular se observó a las 3 y a las 24 horas, pero también tras los tres días de reperusión tanto en la capa de las CGR como en la nuclear interna. Es pues probable, aunque lo desconocemos con exactitud, que en nuestros estudios la forma de muerte neuronal sea también mixta y se haya producido por alguno de los dos tipos citados, necrosis o apoptosis.

Es interesante que en modelos experimentales de isquemia de la retina en los que no se permite la reperusión, todas las capas de la retina presentan muerte neuronal de tipo necrótica (Kroll, 1968; Sakai, 1969; Skabib y Ashton, 1966). Los estudios de Büchi (1992a) sugieren que a las pocas horas del insulto se



producen alteraciones ultraestructurales características de la isquemia aguda irreversible (Kroll, 1968; Sakai, 1969; Skabib y Ashton, 1966) y de la excitotoxicidad (Olney, 1969, 1986) que se piensa que juega un papel importante en el daño isquémico en el SNC (Choi, 1988) y en la retina (Bresnick, 1989; Olney, 1969). Pero también se puede argumentar que estos estudios de Büchi indican que de manera casi inmediata al insulto isquémico se producen también alteraciones ultraestructurales que ocurren tras la axotomía.

Desconocemos también cuál es el mecanismo por el que se produce la degeneración de CGR que observamos en nuestros experimentos en el transcurso de los primeros 5 días desde el insulto inducido por el aumento de PIO por encima de valores sistólicos. Parece probable que esta muerte inicial se deba fundamentalmente a la isquemia a que ha sido sometida la retina y no a un fenómeno de compresión o axotomía de los axones en el disco óptico. En ratas adultas la muerte de las CGR inducida por la lesión de los axones en el disco óptico no se observa hasta pasados los primeros cuatro o cinco días (Berkelaar y cols., 1994; Peinado-Ramón y cols., 1995). Es más, en ratas en las que se inducían aumentos mantenidos de la PIO del doble de los valores normales, la muerte de CGR, que se piensa que está desencadenada por un mecanismo de compresión de los axones de las CGR en el disco óptico, no aparecía significativa hasta los 14 días de instaurar el aumento crónico de PIO (García-Valenzuela y cols., 1995). Sin embargo tras la isquemia reperusión se observa claramente muerte de CGR a las 3, 24 horas y 3 días del insulto (Büchi, 1992a; Sellés, observaciones no publicadas).

5.6.2.2. Muerte retrasada y lenta de CGR inducida por isquemia transitoria

La pérdida progresiva de CGR provocada por un episodio lesivo de isquemia transitoria inducida por aumento de la PIO, que ocurre en el transcurso



del tiempo, entre 5 y 30 días después de la injuria, no ha sido caracterizada previamente. Desconocemos que tipos de muerte neuronal están implicados fundamentalmente en esta fase y si se observan también formas de muerte neuronal apoptótica y necrótica. Podemos postular que los mecanismos lesivos que intervienen en el momento de la isquemia transitoria persisten durante la totalidad del intervalo de reperfusión que sobrevive en animal. Además de los clásicos efectos agudos de la isquemia, como es la muerte que acontece de manera inmediata a la isquemia, se puede pensar en otras circunstancias que intervengan en esta muerte retrasada o lenta que hemos observado en estos estudios:

i) Por ejemplo se podría postular que, de manera similar a lo que ocurre tras la sección del nervio óptico, tras una fase de muerte brusca se desencadena otro tipo de muerte neuronal lenta o retrasada. En estas fases de muerte neuronal podrían actuar mecanismos de alteración del balance electrolítico intracelular, de excitotoxicidad, de compromiso en el transporte axonal retrógrado con deprivación de señales o sustancias derivadas de su territorio de inervación, ó de la fagocitosis microglial (Thanos y cols., 1993; Villegas-Pérez y cols., 1993; García-Valenzuela y cols., 1994).

ii) También se podría pensar que que esta muerte dilatada o retrasada se debería a la degeneración de las CGR secundaria a la muerte de otras neuronas de la retina, situas en otras capas de la retina, que no hemos investigado, pero que se ha observado que se ven afectas por la isquemia (Büchi, 1992a, 1992b; Osborne y cols., 1995). Estudios previos indican que la isquemia transitoria de la totalidad de la retina también afecta además de la capa de las CGR la capa nuclear interna (Hughes, 1991; Büchi, 1992a, Osborne y cols., 1995) y la nuclear externa (Hughes, 1991; Büchi, 1992b). Es posible que la muerte de los fotorreceptores, pero especialmente de las neuronas que componen la nuclear



interna, induzcan la degeneración transneuronal anterógrada de la población de CGR.

iii) También es posible que el incremento de presión intraocular induzca, además de una isquemia transitoria, la obstrucción o compromiso del transporte axonal en la cabeza del nervio óptico por compresión directa de los axones (Quigley y cols., 1995), mimetizando de esta manera los efectos de una axotomía. Si este fuera el caso, se podría esperar una oleada de muerte neuronal inducida por la axotomía que aparecería a partir del 5º día y que sería posterior a la muerte aguda inducida por la isquemia. De hecho en experimentos que han utilizado incrementos de la PIO para semejar la situación del glaucoma se observa obstrucción del transporte axonal retrógrado y anterógrado de las CGR en la cabeza del NO (Quigley) y muerte de apoptótica de CGR (Quigley y cols., 1995; García-Valenzuela y cols., 1995).

Esta es una posibilidad muy atractiva (ver más adelante) y sería interesante dilucidar hasta que punto puede jugar un papel en la muerte observada en nuestros experimentos esta posible compresión axonal y por tanto axotomía. La axotomía induce una muerte neuronal por apoptosis, y este proceso de muerte neuronal se puede influenciar. De hecho la muerte de CGR inducida por axotomía puede verse aminorada o neuroprotegida con la administración intraocular de las neurotrofinas BDNF (Thanos y Mey, 1992; Mansour-Robbaey y cols., 1994; Peinado-Ramón y cols., 1995) y NT-4 (Peinado-Ramón y cols., 1995) y con la administración de otras sustancias con actividad de tipo trófica (Weibel y cols., 1994; Mey y Thanos, 1993; Carmignoto y cols., 1989; Sievers y cols., 1987) o sin ella (Thanos y Mey, 1995).



5.7. ISQUEMIA TRANSITORIA INDUCIDA POR LIGADURA SELECTIVA DE LA ARTERIA OFTÁLMICA: MUERTE DE LAS CGR.

La comparación del efecto de diferentes intervalos de supervivencia o reperusión en la muerte de las CGR inducida por aumentos de la PIO, indicaba que tras una muerte rápida de un proporción importante de la población de CGR, se observaba en el transcurso de los 25 días siguientes otra muerte más lenta o retrasada en el tiempo que también afectaba a una importante proporción de la población de CGR. Una de las posibles explicaciones a esta observación era que el incremento elevado de la PIO causara un daño directo a los axones y somas de las CGR. Para tratar de ahondar en esta cuestión quisimos determinar si la muerte de CGR tendría las mismas características en intensidad y curso temporal tras una isquemia transitoria inducida por el clampaje selectivo de la arteria y vena oftálmicas. A este fin realizamos el grupo experimental F, de animales en los que la isquemia se indujo mediante la ligadura selectiva de la arteria y vena oftálmicas.

Los resultados obtenidos en el grupo F, tras 90 minutos de isquemia y 7 ó 30 días de supervivencia se compararon: 1) con los datos correspondientes del grupo A, analizados a los 30 días, y del grupo C, analizados a los 7 días, tras periodos transitorios de isquemia de 90 minutos inducida por aumento de la PIO. No se observaron diferencias con los datos obtenidos en el grupo C, analizado a los 7 días, pero sí con los del grupo A, analizados a los 30 días; 2) entre sí, no apreciándose diferencias significativas; 3) con sus respectivos controles o retinas contralaterales, mostrando diferencias significativas. Estos experimentos del grupo F muestran que: i) la muerte de CGR inducida por la ligadura de la arteria y vena oftálmicas a los 30 días es similar a la que se observa a los 7 días de inducir la isquemia por aumento de la presión intraocular, y; ii) tras isquemia transitoria inducida por ligadura de la arteria y vena oftálmicas, la muerte de CGR a los 7 días es similar a la que se observa a los 30 días. Podemos sugerir



pues que en este modelo de isquemia vascular, entre el día 7 y el día 30, no hay una progresión temporal de muerte de CGR.

Como en este modelo de isquemia vascular, las CGR y sus fibras no se vieron sometidas a fenómenos compresivos por aumento de la PIO, se puede también sugerir que en el modelo de incremento de PIO, la muerte lenta que aparece entre el 5º y el día 30º es posible que se deba a la lesión añadida que induce el incremento de PIO por encima de los valores sistólicos.

5.8. POSIBLE APLICABILIDAD DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN NUESTROS ESTUDIOS: IMPLICACIONES CLÍNICAS.

El daño isquémico de la retina es un problema clínico común que puede ocurrir en varias enfermedades y conllevar trastornos visuales permanentes. Por ejemplo, el trastorno del flujo sanguíneo debido a alteraciones del drenaje venoso es la causa más común de retinopatía vascular después de la retinopatía diabética. Además, el 15% de las oclusiones venosas de la retina aparecen en enfermos afectados de glaucoma crónico simple, otra enfermedad común que afecta a la retina y que puede conllevar serios trastornos visuales permanentes. Otras situaciones clínicas en las que se puede producir daño isquémico de la retina son la oclusión de la arteria o vena central de la retina, la diabetes, la anemia de células falciformes, la retinopatía del prematuro y el mencionado glaucoma. Las lesiones que cursan con un compromiso de la vascularización de la retina, cursan con muerte de gran parte de la población de células ganglionares. Este tipo de lesiones produce déficits funcionales importantes e irreversibles, ocasionando una disminución de la visión, que es permanente. Un conocimiento detallado y profundo de como la interrupción del flujo vascular puede afectar la población de células ganglionares de la retina es importante y puede abrir nuevas perspectivas en el tratamiento de enfermedades que cursan con isquemia de la



retina incluido el Glaucoma. Uno de los hallazgos clínicos mas frecuentes del glaucoma es la elevación de la presión intraocular. La característica patológica de la retina glaucomatosa es la pérdida de CGR. Si esta muerte selectiva se debe directamente a un efecto de compresión de los axones en el disco óptico, o a la isquemia inducida por el aumento de presión, ó a otros mecanismos sigue siendo materia de discusión.

La patogénesis de la lesión isquémica neuronal es un fenómeno complejo, todavía no comprendido del todo y en el que pueden jugar un papel diversos mecanismos (ver apartado de introducción). Estudios efectuados en el SNC durante las últimas tres décadas han documentado que la lesión neuronal traumática y la isquémica pueden estar mediadas por niveles excesivos de aminóácidos excitadores en especial el glutamato. Varias estrategias experimentales que consisten en tratar de incrementar la supervivencia neuronal, se han explorado para tratar de restaurar la función tras la lesión de las CGR. Además de los antagonistas de los receptores de los amino ácidos excitadores (Tsukahara et al., 1992; Benveniste et al., 1993), de los bloqueantes del calcio (Crosson et al., 1991; Takahashi et al., 1992) y de radicales libres (Szabo et al., 1991), los factores tróficos también pueden jugar un papel neuroprotector contra la lesión neuronal inducida por la isquemia. Por ejemplo se ha sugerido que tras la isquemia pueden tener un efecto directo neuroprotector el factor trófico semejante a la insulina tipo I (insulin like growth factor I; IGF-I) (Zhu et al., 1993), el factor de crecimiento fibroblástico de tipo básico (bFGF) (Morita et al., 1993), el BDNF (Merlio et al., 1993; Comelli et al., 1993) y la neurotrofina 4/5 (Chan et al., 1993).

Una estrategia posible en un intento de tratar de incrementar la supervivencia de la muerte neuronal inducida por la isquemia es el estudio de los efectos de la administración de neurotrofinas determinadas. El modelo propuesto



permite la posibilidad de realizar estudios cuantitativos detallados del posible efecto neuroprotector que pudieran tener diversas moléculas. La observación de que el BDNF (Mansour-Robbaey y cols., 1994; Peinado y cols., 1995), y la neurotrofina-4 NT-4 (Peinado y cols., 1995) pueden rescatar una población de CGR de la muerte inducida por la axotomía sugiere que es posible que CGR lesionadas por otros procesos degenerativos, tal y como ocurre en la isquemia y en el glaucoma, puedan ser también protegidas por las neurotrofinas.

Pensamos que este estudio cuantitativo de la respuesta de las CGR a períodos de isquemia controlada, caracteriza un modelo experimental de trabajo en el que poder explorar los mecanismos celulares y moleculares que acompañan la degeneración de poblaciones neuronales sometidas a isquemia. Por otra parte, la caracterización cuantitativa de la respuesta a la anoxia permitirá en estudios ulteriores asesorar de un modo fiable y cuantitativo el efecto que pudieran tener sustancias introducidas en el globo ocular sobre la supervivencia de las células ganglionares de la retina a corto y a largo plazo.



CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos en los experimentos descritos en esta Tesis Doctoral, sobre la supervivencia de las células ganglionares de la retina de la rata adulta sometidas a diferentes periodos de isquemia transitoria y tras diferentes intervalos de supervivencia, podemos realizar las siguientes conclusiones:

1. En relación con las técnicas utilizadas en este trabajo

1.a. El fluorogold es un trazador neuronal retrógrado que aplicado en el mesencéfalo permite identificar la población de CGR, y persiste en el soma de éstas por períodos de hasta 21 días después de su aplicación. Esto permite realizar estudios cuantitativos de la supervivencia de las CGR marcadas con Fluorogold tras lesiones de tipo isquémico.

1.b. Se puede inducir isquemia transitoria de la retina por incremento de la presión intraocular mediante tracción de la conjuntiva bulbar del ojo del animal. Este método de inducción de la isquemia no invade estructuras intraoculares,



produce una isquemia que afecta a todas las capas de la retina, y permite el control del flujo vascular de la retina durante todo el período que se mantiene la isquemia.

1.c. Se puede producir isquemia transitoria de la retina mediante la ligadura selectiva del paquete vascular oftálmico, sin lesionar el nervio óptico.

2. En relación con la supervivencia de CGR sometidas a isquemia transitoria

2.a. Períodos de isquemia transitoria de la retina iguales o inferiores a 45 minutos, no inducen muerte de las CGR, sin embargo períodos de isquemia de 60 minutos o más, provocan muerte de CGR. Por lo tanto, el umbral de tolerancia de las CGR ante una situación de isquemia total de la retina se encuentra entre 45 y 60 minutos.

2.b. A los 30 días de sufrir períodos de isquemia transitoria de la retina de más de 60 minutos se produce una muerte de CGR que se incrementa conforme aumenta este período de isquemia. Noventa minutos o más de isquemia producen la muerte de un 95% de la población de CGR. Sin embargo, existe una pequeña proporción de CGR, que supone aproximadamente un 5% que no muere incluso tras períodos de isquemia de 120 minutos.

2.c. La muerte de CGR inducida por la isquemia no sólo se ve influenciada por el periodo inicial de isquemia transitoria, sino también por el intervalo de reperfusión o supervivencia del animal. La muerte de CGR parece ocurrir en dos fases: i) Una primera fase, que se observa ya 5 días tras la isquemia y cuya intensidad depende del tiempo de duración de la isquemia transitoria, y; ii) Una segunda fase que afecta a un menor porcentaje de células, y que se desarrolla de una forma más lenta, en la que se observa una pérdida progresiva de CGR que



ocurre entre los 5 y 30 días postisquemia, que es el intervalo de tiempo estudiado.

2.d. La muerte de CGR que se observa tras isquemias transitorias de la retina inducidas por ligadura selectiva de la vascularización ocular parece ocurrir de forma diferente a la que se obtiene tras isquemias inducidas por aumento de la presión intraocular. Tras la ligadura vascular, la muerte de CGR parece producirse en una sola fase que ocurre en los primeros 7 días y que depende del tiempo de isquemia transitoria pero no del intervalo de reperfusión o supervivencia del animal, indicando que quizás el aumento de la PIO necesario para producir la isquemia retiniana pueda desencadenar algún tipo adicional de lesión, que es responsable de la pérdida paulatina y progresiva en el tiempo de las CGR cuando se utiliza este método.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFIA

Anderson, D. R. and Hendrickson, A. (1974). Effect of intraocular pressure on rapid axoplasmic transport in monkey optic nerve. *Invest Ophthalmol.* 13: 771-783.

Anderson, J.R. (1979). *Patología de Muir. Compendio de anatomía patológica y patología general.* Ed. Espax, 17-20

Anderson, D.R. and Davis, B. (1975) Sensitives of oculatr tissues to acute pressure-induced ischemia. *Arch Ophthalmol.* 93: 267-274.

Armstead, W.M., Mirro, R., Busija, D.W. and Leffler, C.W. (1988). Postischemic generation of superoxide anion by newborn pig brain. *Am. J. Physiol* 255 (Heart Circ. Physiol. 24):H401-H403

Adler y Farber (1986). *The retina. A model for cell biology studies.* Part II. Academic Press, Inc, Ed. 27-55. London.

Ascher, P. and Nowak, L. (1988). Quisqualate and kainate activated channels in mouse central neurones in culture. *J. Physiol.* 399: 227-245.

Barde, y. A. (1989). Trophic factors and neuronal survival. *Neuron.* 2: 1525-1534.

Barron, K.D., Dentinger, M.P., Krohel, G., Easton, S.K. and Manke, R. (1986). Qualitative and quantitative ultrastructural observations on retinal ganglion cell layer of rat after intraorbital optic nerve crush . *Journal of Neurocytology* 15:345-362

Ben-Nun, Joshua., Alder, V.A., Cringle, S.J. and Constable, I.J. (1988). A new method for oxygen supply to acute ischemic retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci,* 29:298-304

Benveniste, H., Drejer, J., Schousboe, A. and Diemer, N.H. (1984). Elevation of the extracelular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. *J. Neurochem.* 43: 1369-1374.

Berridge, M.J. and Irvine, R. F. (1989). Inositol phosphates and cell signalling. *Nature* 341: 197-205.

Berkelaar, M., Clarke, D.B., Wang, Y.-C., Bray, G.M. and Aguayo A.J. (1994). Axotomy results in delayed death and apoptosis of retinal ganglion cells in adults rats. *J Neurosci,* 14:4368-4374.

Bron, A. M., Maupoil, V., Garcher, C., Guyonnet, G., Chelqi, E. H. and Rochette, L. (1995). Modification of vitamin E during ischemia-Reperfusion in rat retina. 36: 1084-1087.

- Büchi, E.R. (1992a). Cell death in the rat retina after a pressure -induced ischaemia-reperfusion insult: An electron microscopic study. I. Ganglion cell layer and inner nuclear layer. *Exp Eye Res*, 55:605-613
- Büchi, E.R. (1992b). Cell death in rat retina after pressure-induced ischaemia -reperfusion insult: electron microscopic study. II. Outer nuclear layer. *Jpn J Ophthalmol*, 36:62-68
- Büchi, E.R., Suvaizdis, I. and Fu, J. (1991). Pressure-induced retinal ischemia in rats: An experimental model for quantitative study. *Ophthalmologica*, 203:138-147
- Busto, R., Dietrich, D., Globus, M.Y.-T., Valdés, I., Scheinberg, P. and Ginsberg, M.D. (1987). J Cereb Blood Flow Metabol, Small differences in intras ischemic brain temperature critically determine the extent of ischemic neuronal injury. 7: 729-738.
- Camello, P.J. (1994) Transmisión sináptica. En "Compendio de Fisiología para Ciencias de la Salud". Córdoba, A., Ferrer, M.E., Muñoz, M.E. y Villaverde C. Ed. Interamericana-McGraw Hill, Madrid. 7:61-69.
- Carmignoto, G., Maffei, L., Candeo, P., Canella, R. and Comelli, M.C. (1989) Effect of NGF on the survival of rat retinal ganglion cells following optic nerve section. *J. Neurosci*. 9:1263-1272.
- Cheng, B. and Mattson, M.P. (1991). NGF and bFGF protect rat hippocampal and human cortical neurons against hypoglycemic damage by stabilizing calcium homeostasis. *Neuron*. 7: 1031-1041.
- Cheng, B. and Mattson, M.P. (1992). IGF-I and IGF-II protect cultured hippocampal and septal neurons against calcium-mediated hypoglycemic damage. *J Neurosci*. 12: 1558-1566.
- Choi, D.W. (1988). Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron*. 1: 623-634.
- Choi, D.W. (1988). Calcium mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemia damage. *Trends Neurosci* 11:465-469
- Choi, D. W. (1990). Cerebral hypoxia: some new approaches and unanswered questions. *J. Neurosci*. 10: 2493-2501.
- Choi, D. W. (1990). Methods for antagonizing glutamate neurotoxicity. *Cerebrovasc Brain Metab Rev*. 2:105-147.
- Choi, D. W. (1992). Excitotoxic cell death. *J. Neurobiol*. 23: 1261-1276.
- Cogan, D.G. and Kuwabara, T. (1959). Tetrazolium studies on the retina: II. Substrate dependent patterns. *J Histochem Cytochem* 7:334-341



Coles, J.C., Ahmed, S.N., Mehta, H.U and Kaufman, J.C.E. (1986) Role of radical scavenger in protection of spinal cord during ischemia. *Ann. Thorac. Surg.* 41: 551-556

Collazo, D., Takahashi, H. and McKay, R.D.G. (1992). Cellular targets and trophic functions of neurotrophin-3 in the developing rat hippocampus. *Neuron.* 9: 643-656.

Collier, R.H. and Bethesda, M.D. (1967). Experimental embolic ischemia of the coroid. *Arch Ophthalmol*, 77:683-692

Collins, G. G. S. Anson, J. Probett, G.A. (1981) Patterns of endogenous amino acid release from slices of rat and guinea-pig olfactory cortex. *Brain Res.* 204: 103-120

Cotman, C.W., Monaghan, D.T. and Ganong, A. H. (1988). Excitatory amino acid neurotransmission: NMDA receptors and Hebb-Type synaptic plasticity. *Ann. Rev. Neurosci.* 11: 61-80.

Cowan, W.M., Fawcett, J.W., O'Leary, D.D.M. and Standfield, B.B. (1984). Regressive events in neurogenesis. *Science.* 225: 1258-1265.

Cusick, C.G. and Lund, R.D. (1982). Modification of visual callosal projection in rats. *J. Comp. Neurol.* 212: 385-398.

David, P., Lusky, M. and Teichberg, V.I. (1988). Involvement of excitatory neurotransmitters in the damage produced in chick embryo retinas by anoxia and extracellular high potassium. *Exp. Eye. Res.* 46: 657-662

Del Cerro, H., Jiang, L.q., Wiegand, S.J. and Lazar, E. (1990). In vivo staining of the mammalian retina by means of a simple fluorescence method. *J. Neurosci. Methods.* 32:81-86.

De Schaepdrijver, L., Simoons, P., Lauwers, H. and De Geest, J.P. (1989). Retinal vascular patterns in domestic animals. *Research in veterinary.* 47: 34-42.

Do, K. Q., Mattenber, M., Streit, P. and Cuenod, M. (1986). In vitro release of endogenous excitatory sulfur-containing amino acids from various rat regions. *J. Neurochem.*, 46: 779-786

Díaz-Guerra, M.J, Sánchez -Prieto, J., Bosca, L., Pocock, J, Barrie, A. and Nicholls, D. (1988). Phorbol ester translocation of protein kinase C in guinea-pig synaptosomes and the potentiation of calcium-dependent glutamate release. *Biochim Biophys Acta* 970: 157-165.

Dräger, U. C., Edwards, D.L. and Barnstable, C.J. (1984). Antibodies against filamentous components in discrete cell types of the mouse retina. *J. Neurosci.* 4. 2025-2042.

Dreher, B., Potts, R.A., Ni, S.Y.K. and Bennet, M.R. (1984). The development of

- heterogeneities in distribution and soma sizes of rat retinal ganglion cells. In: *Development of visual pathways in mammals*. Alan. R. Liss. New York. 39-57.
- Ellis, R.E., Yuan, J.Y. and Horvitz, H.R. (1991). Mechanism and functions of cell death. *Ann Rev Cell Biol*. 7:: 663-698.
- Ernster, L. (1988). Biochemistry of reoxygenation injure. *Crit Care Med*. 16: 947-953.
- Faberowski, N., Stefansson, E. and Davidson, R.C. (1989) Local hypothermia protects the retina from ischemia. A quantitative study in the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 30:2309-2313
- Foster, A. C., Gill, R., Woodruff, G.N. (1988). Neuroprotective effects of Mk-801 in vivo: selectivity and evidence for delayed degeneration mediated by NMDA receptor activation. *J Neurosci*. 8: 4745-4754.
- Frandsen A, Dreser J, and Woodruff GN. (1988). Neuroprotective effects of MK-801 in vivo: selectivity and evidence for delayed degeneration mediated by NMDA as well as non-NMDA receptor activation. *J. Neurosci*. 8:4745-4754
- Freeman, B.A. Crapo, J.D. (1982). Free radicals and tissue injury. *Lab. invest*. 47:412-426.
- Fujino, T. and Hamasaki. D.I. (1965). The effect of occluding the retinal and choroidal circulations on the electroretinogram of monkeys. *J. Phisiol*, 180:837-845.
- Fukuda, Y. (1977). A three group classification of rat retinal ganglion cells: Histological an Phisiological studies. *Brain Res*. 119: 327- 344.
- Gallego, A. (1971). Horizontal and amacrine cells in the mamml's retina. *Vision Res.*, Supl. 3: 33-50
- Gallego, A. and Cruz, J. (1965). Mammalian retina: Associational nerve cells in ganglion cell layer. *Science* 150: 1313-1314.
- García-Valenzuela, E., Gorczyca, W., Darzynkiewicz, Z. and Sharma, S. C. (1994) Apoptosis in adutd retinal ganglion cells after axotomy. *J. Neurobiol*. 25: 431-438
- Gehlbach, p. and Purple, R.L. (1994). Enhancement of retinal recovery by conjugated deferoxamine after ischemia-reperfusion. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 35: 669-676.
- Gill, R., Foster, A.C. and Woodruff, G.N. (1987). Systemic addministration of MK-801 protects against ischemia-induced hippocampal neurodegeneration in gerbil. *J Neurosci*, 10: 3343-3349.
- Grehn, F. and Prost, M. (1983). Function of retinal nerve fibers depends on



perfusion pressure: neurophysiologic investigations during acute intraocular pressure elevation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 24:347.

Gluckan, P., Klempt, N., Guan, J., Mallard, C., Sirimanne, E., Dragunow, M., Klempt, M., Sing, K., Williams, C. and Nikolics, K. (1992). A role for IGF-1 in the rescue of CNS neurons following hypoxic-schemic injury. *Biochem Biophys Res Comm*. 182: 593-599.

Grotta, J.C., Picone, C.M., Ostrow, P.T., Strong, R.A., Earls, R.M., Yao, L.P., Rhoades, H.M. and Dedman, J.R. (1990). CGS-19755, A competitive NMDA receptor antagonist, reduces calcium-calmodulin binding and improves outcome after global cerebral ischemia. *Ann Neurol*, 27: 612-619.

Guarnieri, C. and Muscarini, C. (1989). Anti oxy-radical proprieties of trimetazidine. *Research Communication in Chemical Pathology and Pharmacology*, 64: 15-225.

Hangai, M., Yoshimura, N., Yoshida, M., Yabuuchi, K and Honda, Y. (1995). *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 36: 571-578.

Hankins, M. W. and Ikeda, H. (1992). Similarity of the effects of hipoxia and l-Glutamate on the electroretinogram. *Clin. Vision. Sci*. 7: 77-82.

Hallenbeck, J.M., Dutka, A.J., Tanishima, T., Kochanek, P.M., Kumaroo, K.K., Thompson, C.P., Obrenovith, T.P., and Contreras, T.J. (1986). Polimorphonuclear leukocyte accumulation in brain regions with low flow during the early postischemis periods. *Stroke*. 17:246-253

Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (1984). Oxigen toxicity, oxigen radicals, transmisionmetals an diseases. *Biochemistry* 219:1-14, 1984.

Hamasaki, I. and Kroll, A.J. (1968). Experimental central retinal artery occlusion. An electrophysiological study. *Arch Ophthalmol*, 80:243-248

Hayreh, S.S. and March, W. (1979). Pathogenesis of block of rapid orthograde axonal transport by elevated intraocular pressure. *Exp Eye Res*, 28:515-523

Hayreh, S.S. and Weingeist T.A. (1980a). Experimental occlusion of the central artery of the retina. I: Ophthalmoscopic and fluorescein fundus angiographic studies. *Br J Ophthalmol*, 64:896-912

Hayreh, S.S. and Weingeist T.A. (1980b). Experimental occlusion of the central artery of the retina. IV: retinal tolerance time to acute ischaemia. *Br J Ophthalmol*, 64:818-825

Hefti, F., Hartikka, J. and Knusel, B. (1989). Function of neurotrophic factors in the adult and aging brain and their possible use in the tratment of neurodegenerative diseases. *Neurobiol Aging*, 10: 515-553.

- Hughes W.F. (1991). Quantitation of ischemic damage in the rat retina. *Exp Eye Res*, 53: 573-582
- Ikeda, H., Hakins, M.W., Asai, T. and Daews E.A. (1992). Electrophysiological properties of neurones following mild and acute retinal ischaemia. *Exp Eye Res*, 55:435-442
- Iversen, L.L. (1991). Pharmacological approaches to the treatment of ischaemic neuronal damage. *Eye* 5: 93-197
- Janes, G.R. and Bounds, G.W. (1955). The blood vessels of the rat's eye. *Amer. J. Anat.* 96: 357-373
- Jeffery, G., Cowey, A. and Kuypers, H.G.J.M. (1981). Bifurcating retinal ganglion cells in the rat demonstrated by retrograde double labelling. *Exp. Brain Res.* 44: 34-40.
- Johnson, N.F. and Foulds, W. S. (1978) The effects of total acute ischaemia on the structure of the rabbit retina. *Exp eye Res*, 27:45-59
- Kabat h, Denis C, Baher AB. (1941) Recovery of funcion following arrest of the brain circulation. 112:737-47
- Kaga, N., Tso, M.O.M. and Jampol, L.M. (1982). Talc retinopathy in primates: a model of ischemic retinopathy. III. An electronMicroscopic study. *Arch Ophthalmol*, 100:1649-1657
- Kanski, J.J. (1989). *Oftalmología clínica*. Ed. Doyma. 11:19-22.
- Kashii, S., Takahashi, M., Mandai, M., Shimizu, H., Hondoda, Y., Sasa, M., Ujihara, H., Tamura, Y, Yokota, T. and Akaike, A. (1994). protective action of dopamine against glutamate neurotoxicity in the retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 35: 685-
- Kerr, J.F.R., Searle, J., Harmon, B.V. and Bishop, C.J.H. (1987). *Perpectives on mammalian cell death*. Oxfort. Univ. Press, NY. 93-129
- Kerr, R.E., Wyllie, A.H. and Currie, A. H. (1972). Apoptosis, a basic biological phenomenon with wider implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972; 26: 239-245.
- Kimura, H. Okamoto, K. and Sakai, Y. (1985). Modulatory effects of prostaglandins D_2 , E_2 , and $F_{2\alpha}$ on the postsynaptic actions of inhibitory and excitatory aminoacidsin cerebellar purkinje cell dendrites *in vitro*. *Brain Res* 239: 57-69.
- Kroll, A.J. (1968). Experimental cneral retinal artery occlusion. *Arch Ophthalmol*, 79:453-469

Kumar, K., Tilakaratne, N.T., Johnson, P.S., Eggeman, K.t., Michaelis, E.K. (1991). Cloning of cDNA for the glutamate-binding subunit of an NMDA receptor complex. *Nature* 354: 70-73.

Kumar, K., Mattson, M.P., Wang, H., Cheng, B. and Michaelis, E.K. (1992). Antisense oligonucleoties to a 71 kDa glutamate-binding protein decrease expression of functional NMDA receptors. *Soc Neurosci Abstr* 18: 258.

Lee, K.S., Frank, S., Vanderklish, P., Arai, A. and Lynch, G. (1991) Inhibition of proteolysis protects hippocampal neurons from ischemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:7233-7237

Lennie.(1980). Parallel visual pathways. A review. *Vision Res* 20: 561.

Linden, R. and Perry, V.H. (1981). Ganglion cell death within the developing retina: A regulatory role for retinal dendrites ?. *Neuroscience* 7: 2813-227.

Linden, R. and Perry, V.H.(1983). Massive retinotectal projection in rats. *Brain Res.* 272: 145-149.

Linden, R. (1987). Displaced ganglion cells in the retina of the rat. *J. Comp. Neurol.* 258: 138-143.

Louzada-Junior, P., Dias, J.J., Santos, W. F., Lachat, J.J., Bradford, H.F. and Coutinho-Netto J. (1992). Glutamate release in experimental ischaemia of the retina: an approach usin microdialysis. *J. Neurochem.* 59: 358-363

Lucas, D.R. and Newhouse, J.P. (1957). The toxic effect of sodium l-glutamate on the inner layers of the retina. *Arch Ophthalmol.* 58: 193- 201.

Lund, R.D., Lund, J.S. and Wise, R.P. (1974). The organization of the retinal projection to the dorsal lateral geniculate nucleus in pigmented and albino rats. *J. Comp. Neurol.* 158: 383-404.

Nachsen, D.A., Sánchez-Armass. S. and Weinstein, A.M. (1986). The regulation of cytosolic calcium in rat brain synaptosomes by sodium-dependent calcium efflux. *J. Physiol (Lond)* 1986; 381: 17-28.

Nayak, M.S., Kita, M. and Marmor, M.F. (1993). Protection of rabbit retina from injury by superoxide dismutase an catalase. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 34:2018-2022

Neetens, A., Delaunois, A.L., Hendrata, Y. and Rompaey, J.V. (1981) Experimental animal study of the effects of intraocular pressure and sistemic blood pressure on optic pathway action potentials. *Exp Eye Res*, 32:575-581

Nicotera, P., Mc Conkey, D.J., Dypbukt, J.M., Jones, D.P. and Orrenius, S. (1989). Ca^{+2} -activated mechamisms in cell killing. *Drug Metab Rev* 20: 193-201.

- Nozaki, K. Finklestein, S.p., Beal, M.F. (1993). Basic fibroblast growth factor protects against hypoxia/ischemia and NMDA neurotoxicity in neonatal rats. *J Cerebr Blood Flow, Metab*, in press.
- Mansour-Robaey, S., Clarke, D.B., Wang, Y-C, Bray, G.M. and Aguayo, A.J. (1994). Effects of ocular injury and the administration of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) on the survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 91:1632-1636
- Martin, P.R. (1986). The projection of different retinal ganglion cell classes to the dorsal lateral geniculate nucleus in the hooded rat. *Exp. Brain Res*. 62: 77-88.
- Masanori, H., Yoshimura, N., Yoshida, M., Yabuuchi, K. and Honda Y. (1995). Interleukin-1 gene expression in transient retinal ischemia in the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 36:571-578.
- Mattson, M.P (1992). Calcium as sculptor and destroyer of neural circuitry. *Exp. Gerontol*. 27:29-49.
- Mattson, M.P., Guthrie, P.B: Murrain, M. and Kater, S.B. (1989). Roles for mitotic history in the generation and degeneration of hippocampal neuroarchitecture. *J Neurosci*. 9: 1223:1230.
- Mattson, M.P., Zhang, Y. and Bose, S. (1993): Growth factors prevent mitochondrial dysfunction, loss of calcium homeostasis and cell injury, but not ATP depletion in hippocampal neurons. *Exp Neurol*. 121: 1-13.
- McCord, J.M. and Fridovich, I. (1978) The biology and pathology of oxygen radicals. *Ann of Internal Medicine*. 89: 122-127.
- McCord, J.M. (1985). Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *The New England Journal of Medicine*, 312:159-163
- McDonald, J.W., Silverstein, F.S. and Johnston, M.V. (1987). MK-801 protects the neonatal brain from Hypoxic-ischemic damage. *European Journal of Pharmacology*. 140:359-361
- Melamed, S., Ben-Sira, I. and Ben-Shaul, Y. (1981). Acutely Elevated Intraocular pressure on rabbit retinal pigment epithelium and photoreceptors. *Glaucoma*, Jan-Feb.
- Meldrum, B. and Garthwaite, J. (1990) *J. Trends Pharmacol. Sci*. 11:379-387.
- Méndez, M.S. y Demicheli, H. (1992). Potenciales evocados. Somatosensoriales, visuales y auditivos. *Omega, Laboratorios Almirall*, 225-258
- Mey, J. and Thanos, S. (1993). Intravitreal injections of neurotrophic factors support the survival of axotomized retinal ganglion cells in adult rats in vivo. *Brain Res*. 602: 304-317.

Minckler, D.S., Bunt, A.H. and Johanson, G.W. (1977). Orthograde and retrograde axoplasmic transport during acute ocular hypertension in the monkey. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 16:426-441.

Mosinger, J.L., Price, M.T., Bai, H.I., Xiao, H., Wozniak, F. and Olney, J.W. (1991). Blockade of both NMDA and non-NMDA receptors is required for optimal protection against ischemic neuronal degeneration in the vivo adult mammalian retina. *Experimental neurology.* 113: 1017

Ohtsuki, T., Matsumoto, M., Suzuki, K., Taniguchi, N. and Kamada, T. (1993). Effect of transient forebrain ischemia on superoxide dismutases in gerbil hippocampus. *Brain Res,* 620: 305-309.

Olney, J.W. (1969) Glutamate induced retinal degeneration in neonatal mice. Electron microscopy of the acutely evolving lesion. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 28, 455-74.

Olney, J. W. (1978). Neurotoxicidad of excitatory amino acids. In *Kainic Acid as a Tool in Neurobiology.* E. G. McGreer, J. W. Olney and P.L. McGreer, Eds. : 95 - 121. Raven Press. New York, N. Y.

Olney, J.W. (1986). Inciting excitotoxic cytocide among central neurons. *Adv. Exp. Med. Biol.* 203, 455-74.

Ophir, A., Berenshtein, E., Kitrossky, N., Berman, E.R., Photiou, S., Rothman, Z. and Chevion, M. (1993). Hydroxyl radical generation in the cat retina during reperfusion following ischemia. *Exp. Eye. Res.* 57: 351- 357.

Peachey, N.S., Green, D.J. and Ripps, H. (1993). Ocular ischemia and the effects of allopurinol on functional recovery in the retina of the arterially perfused cat eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci,* 34: 58-65

Peinado-Ramón, P. Salvador, M., Villegas-Pérez, Vidal-Sanz, M.(1995). Effects of axotomy and intraocular administration of NT-4, NT-3, and BDNF on the survival of adult rat retinal ganglion cells: A quantitative in vivo study. *Invest. Ophthalmolo. Vis. Sci.* (En prensa).

Pellegrini-Giamprieto, D.E., Cherici, G. Alesiani, M., Carla, V. and Moroni, F. (1990). Excitatory aminoacid release and free radical formation may cooperate in the genesis of ischemia-induced neuronal damage. *J. Neurosci,* 10:1035-1041

Peters, S., Koh, J. and Choy, D.W. (1987). Zinc Selective blocks the action of N-Methyl-D-Aspartato on cortical neurons. *Science* 236:589-593

Perry, V. H. (1979). The ganglion cell layer of the retina of the rat: a Golgy study. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 204: 363-375.

Perry, V. H. (1981). Evidence for an amacrine cell system in the ganglion cell layer

of the rat retina: *Neuroscience*, 6: 931-944.

Perry, V.H. and Linden, R. (1982). Evidence for dendritic competition in the developing retina. *Nature*. 297: 683-685.

Perry, V. H., Henderson, Z. and Linden, R. (1983). Postnatal changes in retinal ganglion cell and optic axon populations in the pigmented rat. *J. Comp. Neurol.* 219: 356-368.

Phelps, C. D. (1983). *Glaucoma: General Concepts*. Duane's. *Clinical Ophthalmology*. 42: 1-8.

Podos, S.M. (1976). Prostaglandins, nonsteroidal antiinflammatory agents and eye disease. *Ophthalmology Clinics. Pharmacology Trans Amer Ophthalmol Soc.* 74: 673-660

Potts, R.A., Dreher, B. and Bennet, M.R. (1982). The loss of ganglion cells in the developing retina of the rat. *Dev. Brain. Res.* 3: 481-486

Purves, D. (1998). The trophic theory of neural connections. *Trends Neurosci*). 486-489.

Quigley, H.A., Nickells, R.W., Kerrigan, L.A., Pease, M., Thibault, D.J. and Zack, D.J. (1995) Retinal ganglion cell death in experimental glaucoma and after axotomy occurs by apoptosis. *Invest Ophthalmol vis Sci.* 36: 774-786

Ramon y Cajal, S. (1892). *La rétine des vertébrés. La cellule*, T. IX, Fasc. 1: 121-225.

Reinecke, R.D., Kuwara, T. Cogan, D. G. and Weiss, D. R. (1962). Retinal vascular patterns. Part V: Experimental Ischemia of the cat Eye. *Arch. Ophthalmol.* 67: 110-115.

Rodiek, R.W. and Brening, R.K. (1973). Retinal ganglion cells: properties, types, genera, pathways and trans-species comparisons. *Brain Behav. Evol.* 23:121-164.

Roth, S. and Pietrzyk. Z. (1994). Blood flow after retinal ischemia in cats. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* (1994). 35:3209-3217

Rothman, S. M., Olney, J. W. (1986) Glutamate and the pathology of hypoxic-ischemic brain damage. *Ann Neurol.* 19:195

Quigley, H.A. and Anderson, D.R. (1976). The dynamics and location of axonal transport blockade by acute intraocular pressure elevation in primate optic nerve. *Invest Ophthalmol.* 15: 606-616.

Quigley, H.A., Addicks, E.M., Green, W.R. and Maumenee, A.E. (1981). Optic nerve damage in human glaucoma: II. The site of injury and susceptibility to

damage. *Arch Ophthalmol.* 1981; 99: 635-649.

Quigley, H.A., Nickells, R.W., Kerrigan, L.A., Pease, M.E., Thibault, D.J. and Zack, D.J. (1995). Retinal ganglion cell death in experimental glaucoma and after axotomy occurs by apoptosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 36:774-786

Sanborn, G. E. and Magargal, L.E. (1990). Arterial Obstructive disease of the eye. *Duane's. Clinical Ophthalmology.* 3:1-29

Sano, Y., Kanematsu, E.H., Yoshiura, M., Iwamoto, T., Takizawa, N., Tokuhisa, T. and Mizuno, A. (1992). Uric acid biochemical marker for retinal and optic nerve damage after occlusion and reperfusion of common carotid and vertebra arteries in rat. *Jpn J Ophthalmol*, 36:76-83.

Sauer, H. and Oertel, W.H. (1994) Progressive degeneration of nigrostriatal dopamine neurons following intrastriatal terminal lesions with 6-hydroxydopamine: A combined retrograde tracing and immunocytochemical study in the rat. *Neurosci.* 59:401-415.

Schmidt, H. Nau, H., Whittfoht, W., Gerlach, J., Prescher, M., Klin, M.M., Niroomand, F. and Böhme, E. (1988). Arginine is a physiological precursor of endothelium-derived nitric oxide. *Eur Pharmacol.* 154: 23-216

Schumed, L.C. and Fallon J.H. (1986). Fluoro-gold: A new fluorescent retrograde axonal tracer with numerous unique properties. *Brain. Res.* 377:147-154

Shou, T. and Zhou, Y. (1989). Y cells in the cat retina are more tolerant than cells to brief elevation of IOP. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 10: 2093-2098.

Siesjo, B.J. (1981). Cell damage in the brain: Aspeculative synthesis. *J. Cereb. Blood flow Meatabol*, 1:155-185

Siesjo, B.J. (1989). Calcium, excitotoxins, and neuronal death in the brain. *Ann NY Acad Sci.* 585: 234-251

Siesjo, B.J. and Bengtsson, F. (1989). Calcium fluxes, calcium antagonist, and calcium-related pathology in brain ischemia, hypoglycemia, and spreading depression: a unifying hypothesis. *J Cereb Blood Flow Metab.* 9: 127-140.

Sievers, J., Hausmann, B., Unsicker, K. and Berry M. (1987) Fibroblast growth factors promote the survival of adult retinal ganglion cells after transection of the optic nerve. *Neurosci. Lett.* 76:157-162.

Sigeno, T., Mima, T., Takamura, K., Graham, D.I., Kato, G., Hashimoto, Y, Furukawa, S. (1991). Amelioration of delayed neuronal death in the hippocampus by nerve growth factor. *J Neurosci* 11: 2914-2919.

Siliprandi, R., Bucci, M.G., Canella, R. and Carmignoto, G. (1988). Flash and

pattern electroretinograms during and after acute intraocular pressure elevation in cats. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 4:558-565

Simon, R. P., Swan, J.H., Griffiths, T. y Meldrum, B.S. (1984). Blockage of N-methyl-D-Aspartate receptors may protect against ischemic damage in the brain. *Science*. 228: 850-852.

Sipperley, C.J., Usaf, M.C., Anderson, D.R. and Hamasaki, D. (1973). Short-Term effect of intraocular pressure elevation on the human electroretinogram. *Arch Ophthalmol*, 90:358-360

Sisk, D.R. and Kuwara, T. (1985). Histologic changes in the inner retina of albino rats following intravitreal injection of monosodium l-glutamate. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol*. 109: 125-134

Stefánson, E., Wilson, C.A., Schoen, T. and Kuwara, T. (1988). Experimental ischemia induces cell mitosis in the adult rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 29: 1050-1055.

Stone, T.W and Connik, J.H. (1985). Quinolinic acid and other kynurenes in the central nervous system. *Neuroscience* 15: 597-617

Szabo, M.E., Droy-Lefaix, M.T., Doly, M. and Braquet, P. (1992). Ischaemia and reperfusion induced Na^+ , K^+ , Ca^{2+} and Mg^{2+} shifts in rat retina: Effects of two free radical scavengers, SOD and EGB 761. *Exp Eye Res*, 55:39-45

Takahashi, K., Lam, T.T., Edward, D.P., Buchi, E.R. and Tso, M.O.M. (1992). Protective effects of flunarizine on ischemic injury in the rat retina. *Arch Ophthalmol*, 110:862-870

Thanos, S. and Mey, J. (1995) Type-specific stabilization and target-dependent survival of regenerating ganglion cells in the retina of adult rats. *J. Neurosci*. 15:1057-1079.

Thoenen, H. (1991). The changing scene of neurotrophic factors. *Trends Neurosci* 14: 165-170.

Thomas, C.E., and Aust, S.D. (1989). Role of metals in oxygen radical reactions and oxidative stress. In : *Handbook of free radicals and antioxidants in biomedicine*. 1:37-48. Ed: J.Miquel. A.T. Quintanilla, H. Weber. Boca raton. Florida. USA. CRC press Inc.

Traystman, R. J., Kirsch, J.R. and Koehler, C. R. (1991). Oxygen radical mechanisms of brain injury following ischemia and reperfusion. *J. Appl. Physiol*. 71: 1185-1995.

Triviño Casado, A. Ramírez Sebastian, J.M. y Garcia Sanchez, J. (1980). *Arch Soc Esp Oftal*. 40: 979-982.

Tsukahara, Y., Blair, N.P., Spellman Eappen, D.C., Moy, J.J, Takahasi, A., Shah, G.K., Viana, M.A.G. (1992). Ketamina suppresses ischemic injury in the rabbit retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 33:1822-25

Ulrich, W. D. and Reimann, J. (1986). Survival and revival times of ischemia in rabbits and cats. *Doc. Ophthalmol.* 63:91-99

Veriac, S., Tissie, G. and Claude Bonne (1993). Oxigen free radicals adversely affect the regulation of vascular tone by nitric oxide in the rabbit retina under high intraocular pressure. *Exp Eye Res.* 56: 85-88.

Vidal-Sanz, M., Villegas-Pérez, M.P., Bray, G.M. and Aguayo, A.J. (1988). Persistent retrograde labeling of adult rat retinal ganglion cells with the carbocyanine dye diI. *Exp. Neurol.* 102: 92-101.

Villegas-Pérez, M.P., Vidal-Sanz, M., Bray, G.H. and Aguayo, A. (1988). Influences of peripheral nerve grafts on the survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells in adult rats. *J. Neurosci.* 8:265-280.

Villegas-Pérez, M.P., Vidal-Sanz, M., Raminsky; M., Bray, G.H. and Aguayo, A.J. (1993). Rapid and protected phases of retinal ganglion cell loss follow axotomy in the nerve of adult rats. *J. Neurobiol.* 24: 23-36.

Walker, n.I., Harmon, B.V., Gobé, G.C. and Kerr, J.F.R. (1988). Patterns of cell death. *Methods Achiev. Exp. Pathol.* 13:18-54.

Weibel, D., Cadelli, D. and Schwab, M.E. (1994) Regeneration of lesioned rat optic nerve fibers is improved after neutralization of myelin-associated neurite growth inhibitors. *Brain Res.* 642:259-266.

Weiss, H. (1976) The carbohidrato reserve in the vitreous body and retina of the rabbit's eye during and after pressure ischaemia and insulin hypoglycaemia. *Ophthalmol Res*, 1:360-71

Williams, G.t. and Smith, C.A. (1993) Molecular regulation of apoptosis: Genetics controls on cell death. *Cell.* 74: 777-779.

Wyllie, A.H., Kerr, J.F.R., and Currie, A.R. (1980). Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* 68:251-306

Wyllie, A.H., Morris, R.G., Smith, A.L. and Dunlop, D. (1984). Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J. Pathol.* 142, 67-77.

Wyllie, A.H. (1985). The biology of cell death in tumors. *Anticancer Res.* 5: 131-6.

Yamamoto, M., Shima, T., Uozumi, T., Sogabe, T., Yamada, K., Kawasaki, T. (1983). A possible role of lipid peroxidation in cellular damages caused by

cerebral ischemia and the protective effect of alpha-tocopherol administration. *Stroke* 14: 977-982.

Yoon, Y.H., Marmor, M.F. (1989). Dextromethorphan protects retina against ischemic injury in vivo. *Arch Ophthalmol*, 107:409-41

Yu, A.C.H., Chan P.H., and Fhisman, R.A. (1986). Effects of arachidonic acid on glutamate and gamma-aminobutyric acid uptake in primary cultures of rat cerebral cortical astrocytes an neurons. *J. Neurochem.* 47: 1181-1189

Zhou, M., Ma. T and Tseng M.T. (1991). Effects of taurine and ketamine on bovine retinal membrane lipid peroxidation. *Neurosci*, 45:461-465