



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES**

**CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ESTUDIO DEL EFECTO DEL ACETATO DE LEUPROLIDA, UN ANÁLOGO
SINTÉTICO DE LA GnRH, EN LA LESIÓN DE RETINA Y NERVIÓ ÓPTICO DE
RATA**

**TESIS QUE PRESENTA
Héctor Esparza Leal.**

PARA OPTAR POR EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

TUTORES

**Dr. José Luis Quintanar Stephano
Dr. Carlos Guillermo Martínez Moreno**

INTEGRANTE DEL COMITÉ TUTORAL

Dr. Javier Ventura Juárez

Aguascalientes, Ags. a 6 de noviembre del 2022

Voto aprobatorio del comité tutorial

CARTA DE VOTO APROBATORIO
INDIVIDUAL

M. en C. JORGE MARTÍN ALFÉREZ CHÁVEZ
DECANO (A) DEL CENTRO CIENCIAS BÁSICAS

PRESENTE

Por medio del presente como **TUTOR** designado del estudiante **Héctor Esparza Leal** con **ID 18056** quien realizó la tesis titulada: **Estudio del efecto del acetato de leuprolida, un análogo sintético de la GnRH, en la lesión de retina y nervio óptico de rata** un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia doy mi consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que el Lic. Esparza Leal pueda proceder a imprimirla así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"
Aguascalientes, Ags., a 07 de noviembre de 2022

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'J. Quintanar'.

Dr. José Luis Quintanar Stephano
Tutor de tesis

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado

Elaborado por: Depto. Apoyo al Posgrado.
Revisado por: Depto. Control Escolar/Depto. Gestión de Calidad.
Aprobado por: Depto. Control Escolar/Depto. Apoyo al Posgrado.

Código: DO-SEE-FO-07
Actualización: 06
Emisión: 17/05/19

Voto aprobatorio del comité tutorial

CARTA DE VOTO APROBATORIO
INDIVIDUAL

M. en C. JORGE MARTÍN ALFÉREZ CHÁVEZ
DECANO (A) DEL CENTRO CIENCIAS BÁSICAS

PRESENTE

Por medio del presente como **TUTOR** designado del estudiante **Héctor Esparza Leal** con **ID 18056** quien realizó la tesis titulada: **Estudio del efecto del acetato de leuprolida, un análogo sintético de la GnRH, en la lesión de retina y nervio óptico de rata** un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia doy mi consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que el Lic. Esparza Leal pueda proceder a imprimirla así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"
Aguascalientes, Ags., a 07 de noviembre de 2022

Handwritten signature of Carlos Guillermo Martínez Moreno in black ink.

Dr. Carlos Guillermo Martínez Moreno
Tutor de tesis

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado

Voto aprobatorio del comité tutorial



CARTA DE VOTO APROBATORIO
INDIVIDUAL

M. en C. JORGE MARTÍN ALFÉREZ CHÁVEZ
DECANO (A) DEL CENTRO CIENCIAS BÁSICAS

PRESENTE

Por medio del presente como **ASESOR** designado del estudiante **Héctor Esparza Leal** con ID 18056 quien realizó la tesis titulada: **Estudio del efecto del acetato de leuproliida, un análogo sintético de la GnRH, en la lesión de retina y nervio óptico de rata** un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia doy mi consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que el Lic. **Esparza Leal** pueda proceder a imprimirla así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"
Aguascalientes, Ags., a 07 de noviembre de 2022

Dr. Javier Ventura Juárez
Tutor de tesis

Interesado
c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado

Elaborado por: Depto. Apoyo al Posgrado.
Revisado por: Depto. Control Escolar/Depto. Gestión de Calidad.
Aprobado por: Depto. Control Escolar/ Depto. Apoyo al Posgrado.

Código: DD-SEE-FD-07
Actualización: 01
Emitido: 17/05/19

Fecha de dictaminación dd/mm/aa: 10-nov-22

NOMBRE: HÉCTOR ESPARZA LEAL ID 18056

PROGRAMA: DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS, MODALIDAD TRADICIONAL LGAC (del posgrado): AS EN LA RESPUESTA INMUNE LA PLASTICIDAD Y LA SECRECIÓN NE

TIPO DE TRABAJO: (X) Tesis () Trabajo práctico

TÍTULO: ESTUDIO DEL EFECTO DEL ACETATO DE LEUPROLIDA, UN ANÁLOGO SINTÉTICO DE LA GnRH, EN LA LESIÓN DE RETINA Y NERVIÓ ÓPTICO DE RATA

IMPACTO SOCIAL (señalar el impacto logrado):

CONTRIBUYE A DETERMINAR EL EFECTO TERAPÉUTICO DEL ACETATO DE LEUPROLIDA EN LAS LESIONES DE RETINA Y NERVIÓ ÓPTICO DE RATA, CON VIAS DE APLICARLO EN SERES HUMANOS

INDICAR SI/NO SEGÚN CORRESPONDA:

Elementos para la revisión académica del trabajo de tesis o trabajo práctico:

- SI El trabajo es congruente con las LGAC del programa de posgrado
- SI La problemática fue abordada desde un enfoque multidisciplinario
- SI Existe coherencia, continuidad y orden lógico del tema central con cada apartado
- SI Los resultados del trabajo dan respuesta a las preguntas de investigación o a la problemática que aborda
- SI Los resultados presentados en el trabajo son de gran relevancia científica, tecnológica o profesional según el área
- SI El trabajo demuestra más de una aportación original al conocimiento de su área
- SI Las aportaciones responden a los problemas prioritarios del país
- NO Generó transferencia del conocimiento o tecnológica

El egresado cumple con lo siguiente:

- SI Cumple con lo señalado por el Reglamento General de Docencia
- SI Cumple con los requisitos señalados en el plan de estudios (créditos curriculares, optativos, actividades complementarias, estancia, predoctoral, etc)
- SI Cuenta con los votos aprobatorios del comité tutorial, en caso de los posgrados profesionales si tiene solo tutor podrá liberar solo el tutor
- NO Cuenta con la carta de satisfacción del Usuario
- SI Coincide con el título y objetivo registrado
- SI Tiene congruencia con cuerpos académicos
- SI Tiene el CVU del Conacyt actualizado
- SI Tiene el artículo aceptado o publicado y cumple con los requisitos institucionales (en caso que proceda)

En caso de Tesis por artículos científicos publicados:

- SI Aceptación o Publicación de los artículos según el nivel del programa
- SI El estudiante es el primer autor
- SI El autor de correspondencia es el Tutor del Núcleo Académico Básico
- SI En los artículos se ven reflejados los objetivos de la tesis, ya que son producto de este trabajo de investigación.
- SI Los artículos integran los capítulos de la tesis y se presentan en el idioma en que fueron publicados
- SI La aceptación o publicación de los artículos en revistas indexadas de alto impacto

Con base a estos criterios, se autoriza se continúen con los trámites de titulación y programación del examen de grado

SI No

FIRMAS

Elaboró:

* NOMBRE Y FIRMA DEL CONSEJERO SEGÚN LA LGAC DE ADSCRIPCIÓN:

DR. DANIEL CERVANTES GARCÍA

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO TÉCNICO:

DRA. ALMA LILIAN GUERRERO BARRERA

* En caso de conflicto de intereses, firmará un revisor miembro del NAB de la LGAC correspondiente distinto al tutor o miembro del comité tutorial, asignado por el Decano.

Revisó:

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO:

DR. JUAN JAUREGUI RINCÓN

Autorizó:

NOMBRE Y FIRMA DEL DECANO:

M. en C. JORGE MARTÍN ALFEREZ CHÁVEZ

Nota: procede el trámite para el Depto. de Apoyo al Posgrado

En cumplimiento con el Art. 105C del Reglamento General de Docencia que a la letra señala entre las funciones del Consejo Académico: Cuidar la eficiencia terminal del programa de posgrado y el Art. 105F las funciones del Secretario Técnico, llevar el seguimiento de los alumnos.

Certificado de aceptación de artículo para publicación

Ciencia & Tecnología para la
Salud Visual y Ocular
Science and Technology in Ocular Health and Vision

Bogotá-Colombia, 04 de noviembre de 2022

LA REVISTA CIENCIA Y TECNOLOGIA PARA LA SALUD VISUAL Y OCULAR

ISSN: 1692-8415 ISSN electrónico: 2389-8801

CERTIFICA:

Que el artículo original "Leuprolide acetate, a GnRH agonist, holds up neurodegeneration in an experimental glaucoma model" escrito por: Héctor Esparza-Leal, Carlos G. Martínez-Moreno, Javier Ventura-Juárez y J. Luis Quintanar, ha sido aceptado y se encuentra en proceso de edición para ser publicado en el volumen 20 N° 2 de nuestra revista.

Atentamente,



NANCY PIEDAD MOLINA MONTOYA

OPTÓMETRA, MSC., PHD.

EDITOR EN JEFE

REVISTA CIENCIA Y TECNOLOGÍA PARA LA SALUD VISUAL Y OCULAR

Agradecimientos

A la Universidad Autónoma de Aguascalientes y al Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México por las herramientas, recursos y facilidades brindados para mi formación y a todas las personas de ambas instituciones que directa o indirectamente participaron de mi aprendizaje y la conclusión de este proyecto.

A mis tutores Dr. José Luis Quintanar Stephano, Dr. Carlos Guillermo Martínez Moreno y Dr. Javier Ventura Juárez por su guía, enseñanza y valiosos consejos.

A la Dra. Alma Lilián Guerrero Barrera, la Mtra. María Guadalupe Valdés Reyes y la Mtra. Elizabeth Casillas Casillas por su paciencia y gran apoyo para la conclusión de este proyecto académico.

A mi más pura fuente de inspiración, mis pequeños gigantes Matías y René, por los muchos e invaluable momentos sacrificados en el camino.

A Diana, mi mayor fuente de vitalidad, cordura y demencia. Por su furor y pasión. Por su amor y entrega total. Por las incontables noches de desvelo, codo a codo en el laboratorio. Por todo, mil gracias.

Dedicatorias

A Diana, Matías y René.

A mis padres y mi hermano.

A mis estudiantes.

A mis pacientes.

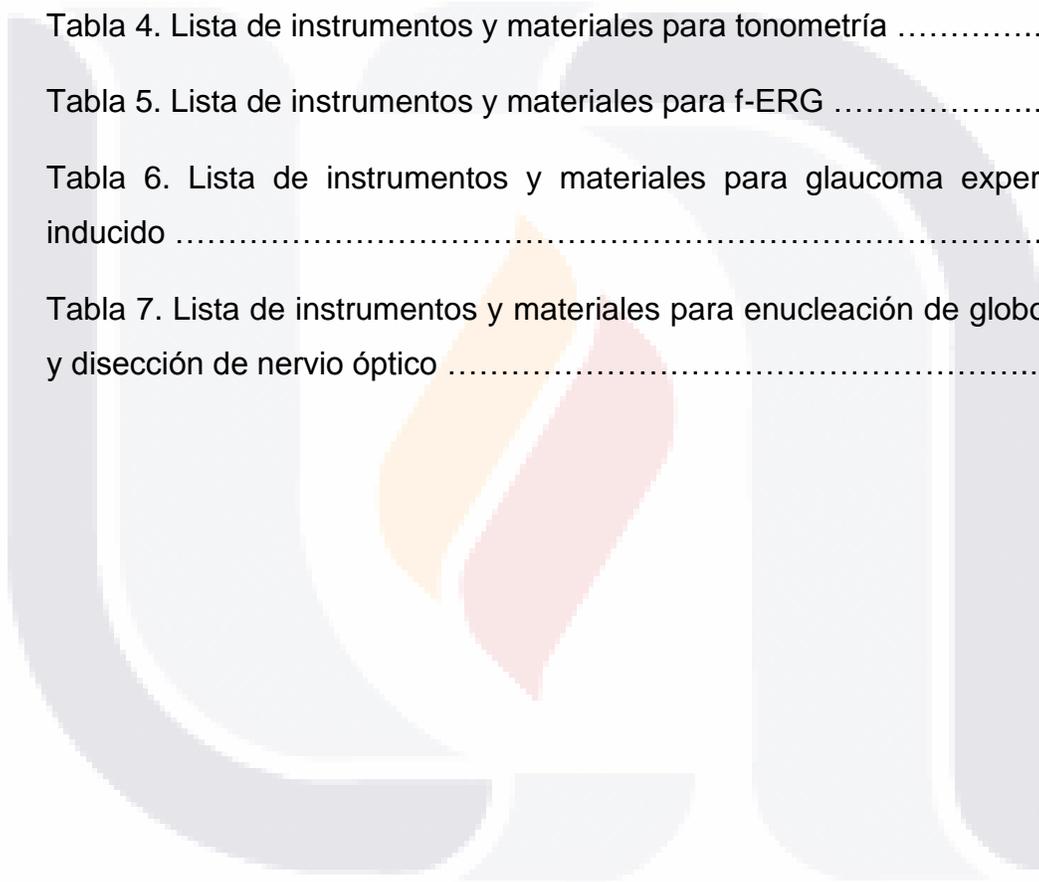


Índice general

Resumen	5
Abstract	6
Introducción.....	7
Planteamiento del problema.....	10
Justificación.....	17
Referentes teóricos y conceptuales.....	19
Objetivos.....	34
Diseño metodológico.....	35
Procedimientos y equipo.....	37
Resultados.....	61
Discusión.....	69
Conclusiones.....	72
Referencias Bibliográficas.....	73

Índice de tablas

Tabla 1. Diseño metodológico	35
Tabla 2. Conceptualización de variables	36
Tabla 3. Lista de instrumentos y materiales para orquidectomía	42
Tabla 4. Lista de instrumentos y materiales para tonometría	44
Tabla 5. Lista de instrumentos y materiales para f-ERG	50
Tabla 6. Lista de instrumentos y materiales para glaucoma experimental inducido	55
Tabla 7. Lista de instrumentos y materiales para enucleación de globo ocular y disección de nervio óptico	59



Índice de gráficas e imágenes

Gráfica 1. Curva de estandarización de la PIO durante la administración de AH/HPMC	61
Gráfica 2. Presión intraocular promedio de los ojos derecho e izquierdo inyectados durante dos semanas con AH/HPMC y solución salina respectivamente	62
Gráfica 3. Amplitud inicial de la onda a-b y relación b/a	63
Gráfica 4. Amplitud de la onda a-b y la relación b/a después de la inducción de hipertensión ocular	64
Gráfica 5. Amplitud de la onda a-b y relación b/a después del tratamiento con acetato de leuprolida	65
Imagen 1. Distribución de grupos de estudio	37
Imagen 2. Cronología de experimentos.....	39
Imagen 3. Ensamble del sistema de adquisición de datos	46
Imagen 4. Pre-registro de señales eléctricas	47
Imagen 5. Microfotografías de la retina	66
Imagen 6. Microfotografías de nervio óptico	67

Acrónimos

AH	Ácido hialurónico
AL	Acetato de leuprolida
CGR	Células ganglionares de la retina
CNTF	Factor neurotrófico ciliar
f-ERG	Electrorretinograma simultáneo de campo completo
FSH	Hormona folículo-estimulante
GAG	Glucosaminoglicanos
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas
HE	Hematoxilina
HPMC	Hidroxipropil-metilcelulosa
IgG	Inmunoglobulina G
LH	Hormona luteinizante
LIF	Factor inhibidor de leucemia
mmHg	Milímetros de mercurio
MT	Malla trabecular
mTOR	Objetivo mamífero de rapamicina
N.O.	Nervio óptico
PIO	Presión intraocular
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico
TBS	Buffer Tri-salino
TTBS	Tween Buffer Tri-salino

Resumen

El glaucoma es la principal causa de ceguera irreversible en el mundo, es una neuropatía óptica progresiva multifactorial que se correlaciona con alteraciones de la cabeza del nervio óptico, muerte de las células ganglionares de la retina y pérdida del campo visual periférico. Se ha informado recientemente que la hormona liberadora de gonadotropina y su análogo sintético, acetato de leuprolida, tienen propiedades neurotróficas. El objetivo de este trabajo fue determinar si la administración de acetato de leuprolida retarda el proceso neurodegenerativo de la retina y del nervio óptico en un modelo experimental de glaucoma evaluado mediante análisis histológico y electroretinográfico. Se utilizaron ratas Wistar macho divididas en tres grupos: 1) control 2) glaucoma inducido por ácido hialurónico y 3) glaucoma inducido por ácido hialurónico más tratamiento con acetato de leuprolida. El acetato de leuprolida se administró por vía intramuscular durante cuatro semanas, las respuestas eléctricas se registraron mediante electroretinografía simultánea de campo completo, los ojos se procesaron para estudio histológico de retina y nervio óptico. Los resultados mostraron un aumento significativo en la amplitud de la onda a-b y la relación b/a del electroretinograma de las ratas con glaucoma tratadas con acetato de leuprolida respecto a las que no recibieron tratamiento y fueron similares a las del grupo control. El análisis histológico mostró que la densidad de las fibras del nervio óptico y la astrogliosis reactiva de las ratas con glaucoma tratadas con acetato de leuprolida era semejante al de las ratas controles. En conclusión, el acetato de leuprolida es una potencial alternativa de tratamiento en el glaucoma ya que frena el proceso neurodegenerativo de la retina y el nervio óptico, mejora la actividad eléctrica, induce la recuperación de las fibras nerviosas y reduce la astrogliosis reactiva.

Palabras clave: ceguera, baja visión, neurotrófico, regeneración.

Abstract

Glaucoma is the main cause of irreversible blindness around the world, it is a multifactorial progressive optic neuropathy that correlates with optic nerve head disturbances, retinal ganglion cell death, and peripheral visual field loss. Gonadotropin-releasing hormone and its synthetic analog leuprolide acetate have recently been reported to have neurotrophic properties. The aim of this work was to determine whether administration of leuprolide acetate holds up the neurodegenerative process of the retina and optic nerve in an experimental glaucoma model evaluated through histological and electroretinographic analysis. Male Wistar rats divided into three groups were included: 1) control 2) hyaluronic acid-induced glaucoma, and 3) hyaluronic acid-induced glaucoma plus leuprolide acetate treatment. The leuprolide acetate was administered intramuscularly for four weeks, the electrical responses were recorded by simultaneous full-field electroretinography and the eyes were processed for histological study of retina and optic nerve. The results showed a significant increase in the amplitude of the a-b wave and the b/a ratio of the electroretinogram of rats with glaucoma treated with leuprolide acetate respect to those without treatment and were like those of control group. The histological analysis showed that the density of optic nerve fibers, and the reactive astrogliosis of rats with glaucoma treated with leuprolide acetate were like controls without glaucoma. In sum, leuprolide acetate is a potential alternative treatment in glaucoma since it holds up the neurodegenerative process of the retina and optic nerve, improves the electrical activity, induce the recovery of fibers from optic nerve, and reduce the reactive astrogliosis.

Keywords: blindness, low vision, neurotrophic, regeneration.

Introducción

El glaucoma es la principal causa de ceguera irreversible en todo el mundo ⁽¹⁾, es una neuropatía óptica multifactorial y progresiva que se correlaciona con la pérdida del campo visual periférico. Las alteraciones de la cabeza del nervio óptico y la muerte de las células ganglionares de la retina son las características estructurales distintivas de la enfermedad, aunque el glaucoma no solo se limita a la retina interna, sino que informes recientes han demostrado que las anomalías se extienden a los fotorreceptores y a las capas plexiformes externa e interna de la retina.^(2,3) Además, también se han informado alteraciones en varios lugares de la vía visual central, como el núcleo geniculado lateral, el colículo superior y la corteza visual primaria. ^(3,4) La fisiopatología de la muerte celular en el glaucoma sigue sin estar clara, pero la apoptosis, el estrés oxidativo, la neuroinflamación inmunomediada, la supresión neurotrófica por bloqueo del transporte axoplásmico y la excitotoxicidad por óxido nítrico y glutamato se han descrito como los principales mecanismos asociados. ⁽⁵⁾ La presión intraocular (PIO) elevada es el principal factor de riesgo relacionado con la aparición de esta neuropatía y el único modificable asociado a la limitación del daño.⁽⁶⁾

El daño a la retina y al nervio óptico en el glaucoma se considera una condición potencialmente incurable porque el sistema nervioso central de los mamíferos no tiene capacidad regenerativa intrínseca. Recientemente, se han estudiado experimentalmente varios factores neurotróficos por sus propiedades regenerativas solos o en sinergia con otros factores, algunos de ellos también probados en lesiones tanto de la retina como del nervio óptico. La administración intravítrea de factor neurotrófico derivado del cerebro se usó con éxito para prevenir la pérdida de células ganglionares de la retina en la hipertensión ocular aguda ⁽⁷⁾, mientras que el factor de crecimiento de fibroblastos-2 estimula la recuperación del axón en el nervio óptico ⁽⁸⁾, se ha informado que en combinación con neurotrofina-3 y factor de crecimiento nervioso, induce una regeneración sustancial. ^(9,10)

La recuperación sustancial de axones mielinizados en la transección completa del nervio ciático correlacionada con una mayor actividad electromiográfica en un modelo de rata evidencia las propiedades neurotróficas de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) y su análogo sintético acetato de leuprolida, independientemente de su papel en el sistema reproductivo.⁽¹¹⁾ El acetato de leuprolida también modificó las áreas de materia gris y blanca, disminuyó el área de la cicatriz, promovió la recuperación del tejido preservado y mejoró la locomoción en ratas lesionadas en la médula espinal.⁽¹²⁾ Además, la administración de leuprolida induce un aumento en el diámetro axonal de las fibras de la médula espinal de ratas con encefalomielitis autoinmune experimental.⁽¹³⁾

El acetato de leuprolida es un nonapéptido sintético, agonista de la GnRH ⁽¹⁴⁾, menos susceptible a la proteólisis enzimática y con mayor afinidad por su receptor, lo que aumenta su efecto biológico. El acetato de leuprolida es un fármaco seguro y tolerable con pocos efectos secundarios que se utiliza en el tratamiento del cáncer de próstata, endometriosis, fibromas uterinos, pubertad precoz, edema pulmonar, infarto de miocardio, fecundación in vitro y complicaciones de la lesión de médula espinal, como la enfermedad intestinal y la vejiga neurógena.⁽¹⁵⁾ La función más conocida del acetato de leuprolida es la supresión de la secreción de la hormona luteinizante gonadotrópica y la hormona folículo estimulante y, en consecuencia, la supresión de los esteroides sexuales gonadales.⁽¹⁴⁾ Recientemente se ha demostrado que el acetato de leuprolida también tiene propiedades neurotróficas como crecimiento neurítico, aumento del diámetro de las fibras nerviosas y aumento de la expresión de neurofilamentos.⁽¹³⁾ La presencia extrapituitaria y el papel no reproductivo de la GnRH y su receptor se han descrito en varios tejidos, incluidas las neuronas cerebrales corticales y del hipocampo. En el ojo humano, se ha informado que los receptores de GnRH están presentes en el epitelio corneal, el epitelio conjuntival, el epitelio no pigmentado del cuerpo

ciliar, el músculo ciliar, la malla trabecular, el epitelio del cristalino y abundantemente en el nervio óptico y la retina neural.⁽¹⁶⁾ El objetivo de este estudio fue determinar si la administración de acetato de leuprolida retarda el proceso neurodegenerativo de la retina y el nervio óptico en un modelo experimental de glaucoma en ratas evaluado mediante análisis histológico y electroretinográfico. En ese caso, se podría desarrollar una nueva línea de investigación sobre el efecto de los factores neurotróficos en el glaucoma.



Planteamiento del problema

Magnitud

La neuropatía óptica es la primera causa de discapacidad visual irreversible en el mundo ⁽¹⁷⁾, desafortunadamente su manejo aún se orienta principalmente al retraso y la limitación del daño; la adaptación del sujeto a su nueva condición mediante ayudas electrónicas, ópticas y no-ópticas; la enseñanza de técnicas de orientación y movilidad; y ocasionalmente terapia ocupacional y asistencia psicológica.

En el mundo cerca de 40 millones de personas presentan ceguera total y más de 285 millones cursan con baja visión, lo que representa para los estados y sus sistemas de salud un costo económico de alrededor de 2.7 billones de dólares anuales; en México se estima que el costo anual asciende a casi 4570 mdp, sin embargo, resulta complicado brindar un panorama que describa fielmente la problemática en todas sus dimensiones.⁽¹⁷⁾

Trascendencia

Más allá de la magnitud de los costos económicos que representa, la discapacidad visual tiene efectos negativos trascendentales en el escenario de la vida humana, entre los que destaca la mayor tendencia a trastornos sociales y de salud como la pérdida de años/vida-saludable; el aislamiento y la ruptura de las relaciones interpersonales; el ausentismo laboral y el desempleo; trastornos psicológicos como el deterioro cognitivo, ansiedad, depresión y suicidio; aumento en el riesgo de accidentes y lesiones; sedentarismo y enfermedades metabólicas. Todo ello conlleva a un aumento en la demanda y el costo de los servicios de salud y, por si fuera poco, se complica aún más por las grandes limitantes en el acceso a la salud.⁽¹⁷⁾

Naturaleza del problema y factores relacionados.

La visión es un sistema sensorial predominante que en conjunto con los demás sistemas sensoriales del sistema nervioso y los sistemas inmune y endocrino, informan constantemente al organismo acerca de sus múltiples estados en relación a las condiciones internas y externas para generar conductas biológicamente adecuadas y regular procesos internos.⁽¹⁸⁾ El globo ocular es el órgano receptor de la visión, en su superficie interna se localiza la retina, un tejido nervioso fotosensible que se encarga de convertir la energía luminosa proveniente del medio ambiente en un mensaje eléctrico que contiene información relativa a las características físicas, intensidad, duración y localización espacial de los estímulos visuales. Este código eléctrico se despliega a través del nervio óptico a varias estructuras del sistema nervioso central (SNC) para la generación de imágenes visuales; el control de los reflejos oculares; el control de ritmos circadianos y circanuales; la memoria y el aprendizaje; y la regulación de la estrecha relación entre el movimiento ocular y los mecanismos de atención sensorial.⁽¹⁹⁾

El origen de las enfermedades de la retina y el nervio óptico es muy diverso y en gran parte aún desconocido, entre las causas se identifican trastornos de origen isquémico, inflamatorio, compresivo, degenerativo, edematoso, traumático y glaucomatoso. Aunque algunos factores como el estado general de salud, la herencia, la edad, el género, el grupo étnico o el estado mental aumentan el riesgo de desarrollar glaucoma, en general se considera que la PIO es un elemento clave en los cambios moleculares, funcionales y estructurales que se manifiestan en diferentes tejidos del polo posterior del ojo y que finalmente se traducen en impedimento visual ⁽²⁰⁾, aunque también se sabe que a pesar de reducir y estabilizar el valor de la PIO el daño a los tejidos continua y que en personas con una lesión preexistente, el daño por glaucoma puede ser aún mayor que en personas con presiones semejantes. ⁽²¹⁾

En la porción más interna del limbo esclero-corneal se localiza el aparato de reabsorción del humor acuoso compuesto por la malla trabecular -dividida en tres regiones estructural y funcionalmente distintas-, los canales colectores internos y externos, el canal de Schlemm, un plexo venoso episcleral, las venas acuosas, las células endoteliales y los elementos de su matriz extracelular que llevan a cabo un importante proceso fagocítico de limpieza y participan en la regulación de la resistencia al flujo de salida del humor acuoso. Su función es determinante para mantener el delicado equilibrio entre la producción y el drenaje del humor acuoso a través de la vía convencional. Su participación se puede ver comprometida significativamente al aumentar la cantidad de partículas indigeribles de gran tamaño, aumentando la resistencia al flujo de salida y la PIO en consecuencia. Otras causas, como la inhibición inducida por antiinflamatorios esteroideos, pueden tener un efecto semejante.

(22)

En las últimas décadas se ha postulado un daño mecánico directo e insuficiencia vascular de la cabeza del N.O. relacionadas a hipertensión ocular como responsables de la muerte de neuronas ganglionares, sin embargo, en la actualidad ambas se consideran solo factores de riesgo junto con el estado refractivo, la edad, el género, el grupo étnico, enfermedades sistémicas, antecedentes familiares, entre otros. Existen también algunos mecanismos presión-independientes asociados al desarrollo y progresión de la neuropatía óptica de tipo glaucomatoso. La muerte masiva de neuronas ganglionares en el glaucoma obedece a un desequilibrio de los procesos bioquímicos y parece seguir la misma ruta final en diversas neuropatías ópticas incluso a pesar de que la causa inicial haya sido eliminada. Recientemente se han descrito los siguientes mecanismos de muerte de las células ganglionares en glaucoma.

(21)

- a) Apoptosis
- b) Supresión de neurotrofinas por bloqueo del transporte axoplásmico.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- c) Daño oxidativo por inhibición del sistema retiniano de defensa antioxidante.
 - d) Toxicidad inducida por óxido nítrico.
 - e) Toxicidad inducida por glutamato.

Por otro lado, todos los tipos de células gliales de la retina y el N.O. interactúan estrechamente con sus neuronas, modulando sus sinapsis, produciendo factores de crecimiento, amortiguando la concentración de iones y neurotransmisores en el espacio extracelular, regulando en parte su metabolismo o bien aportando nutrientes celulares. Factores intrínsecos, como la supresión del objetivo mamífero de rapamicina (mTOR) -una molécula neuronal que promueve la regeneración de las células ganglionares en etapas tempranas del desarrollo- y factores extrínsecos -como la activación de astrocitos, células de Müller, microglía y oligodendrocitos- son determinantes en la degeneración de la retina y el N.O. ⁽²³⁾

Diversos autores han descrito el efecto negativo del microambiente celular en la tasa de sobrevivencia y capacidad de regeneración de las células ganglionares de la retina y el N.O. Apenas unas horas después de la lesión, los astrocitos son los primeros en responder, se activan incluso antes que la microglia y los oligodendrocitos. En la fase aguda, los astrocitos reaccionan mediante un proceso llamado astrogliosis que inicialmente puede tener ciertos efectos neuroprotectores como la liberación de glutatión con fines antioxidantes, aumento en la amortiguación del potasio y en la absorción de glutamato. Sin embargo, se sabe que a mediano y largo plazo la astrogliosis tiene efectos negativos como la compresión mecánica de las fibras nerviosas, cambios morfogénéticos y una cicatrización astrogliar que limita física y molecularmente la sobrevivencia y regeneración de las células nerviosas. Los cambios en las células de Müller y la microglia conducen a la acumulación extracelular de glutamato y la liberación masiva de radicales libres provocando un severo daño por citotoxicidad y oxidación; los oligodendrocitos incrementan la expresión de una serie de proteínas inhibitoras del crecimiento axónico

como la mielina asociada a glicoproteínas, la mielina oligodendrocítica y las semaforinas; por su parte, las interneuronas amácrinas presentes en la capa plexiforme interna liberan gran cantidad de Zinc que finalmente es absorbido por las células ganglionares agravando el proceso degenerativo y complicando aún más la situación ^(23,24)

Antecedentes

El primer antecedente de regeneración de células ganglionares se remonta a 1928 cuando Francisco Tello -estudiante de Santiago Ramón y Cajal- reportó el crecimiento de axones de algunas células ganglionares incubadas en un nervio periférico, Tello declaró que la incapacidad regenerativa del SNC no parecía ser intrínseca sino que parecía relacionarse a la ausencia de las células de Schwann presentes en el sistema nervioso periférico.^(25,26) En 1985, Aguayo y su equipo estudiaron el rol de la neuroglia en el éxito o fracaso de la regeneración axonal trasplantando sustrato glial periférico en neuronas lesionadas de la médula espinal, cinco años después emplearon un injerto de nervio periférico para unir un nervio óptico seccionado de rata al colículo superior del mesencéfalo, rastrearon el crecimiento de células ganglionares de la retina mediante trazadores moleculares, microscopía electrónica e inmunohistoquímica y lo correlacionaron con la respuesta electrofisiológica a la estimulación luminosa insertando microelectrodos en el colículo superior. Como resultado encontraron un marcado aumento en la expresión de proteína asociada al crecimiento (GAP43), axones ganglionares en crecimiento dentro del injerto de nervio periférico y sinaptización con el colículo superior; los registros eléctricos revelaron respuestas postsinápticas inhibitorias y excitatorias a la estimulación luminosa. ⁽²⁷⁾

En 2009, Quintanar y colaboradores observaron la presencia extrapituitaria de receptores para GnRH en neuronas de la corteza cerebral y de la médula espinal de embriones de rata por RT-PCR, electroforesis e

inmunohistoquímica. El equipo de investigadores logró demostrar que la GnRH tiene un importante efecto en el crecimiento neurítico y la expresión de espinofilina y neurofilamentos, es decir, tiene efectos neurotróficos y representa un potencial agente regenerador del sistema nervioso.^(28,29,30)

La GnRH es una neurohormona hipotalámica simple pues su estructura química tiene una cadena de apenas 10 aminoácidos y un peso molecular de solo 1.2 kDa, es liberada desde el hipotálamo hacia el sistema portal hipotálamo-hipofisiario, sus receptores se localizan en los gonadotropos de la adenohipófisis, donde estimulan la síntesis y secreción de la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH). La FSH se relaciona con la producción de óvulos y espermatozoides, mientras la LH promueve la síntesis de estrógenos, progesterona y testosterona, entre otras funciones reproductivas.⁽³¹⁾

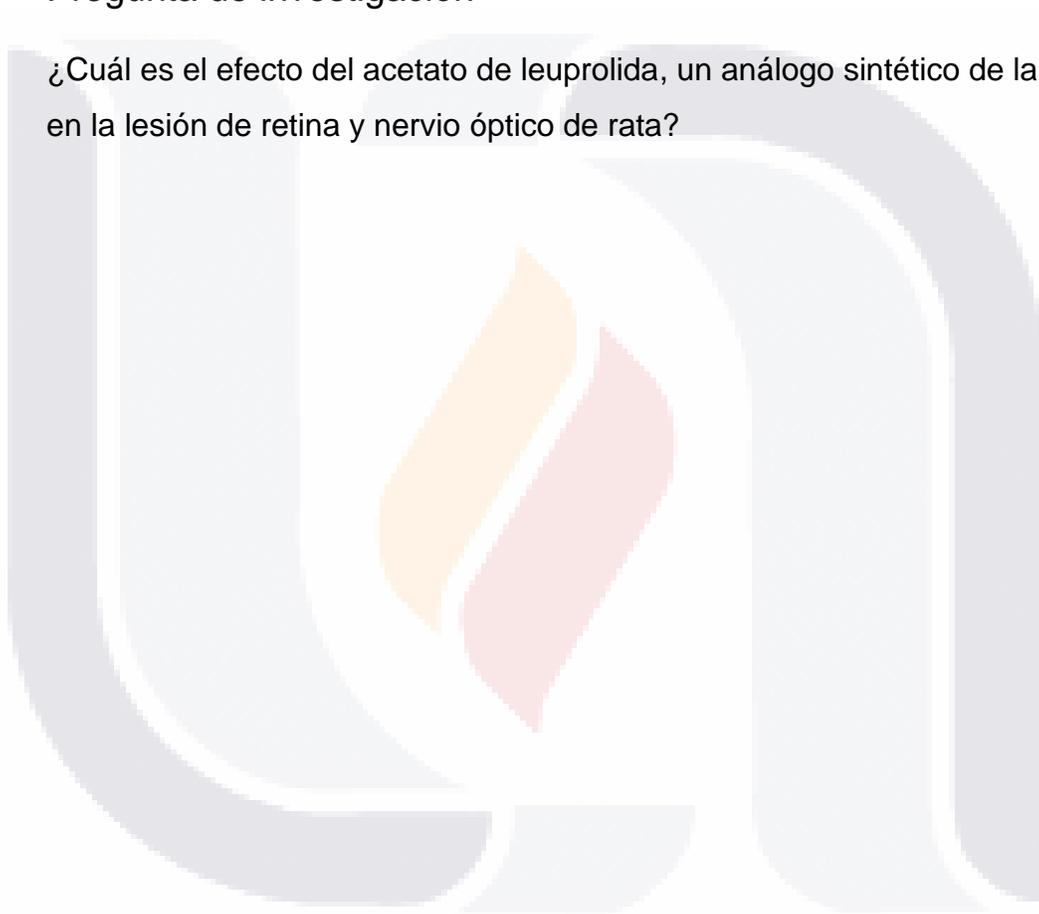
En 2015, Calderón-Vallejo y colaboradores demostraron que la administración de GnRH mejora la actividad locomotora, la función de la vejiga y la expresión de neurofilamentos en ratas con lesión de la médula espinal.⁽³²⁾ En el mismo año Díaz-Galindo y su equipo demostraron que el AL, un análogo sintético de la GnRH, mejora por un lado la actividad locomotora y la marcha, el reflejo de micción y la morfología de la médula espinal y, por otro, logra reducir el área microglial en un modelo de lesión de la médula espinal en rata.⁽³³⁾

El AL es un análogo sintético de la GnRH que es menos susceptible de proteólisis por peptidasas, muestra mayor afinidad por los receptores para GnRH, tiene un tiempo de vida-media más largo que la hormona GnRH natural y es capaz de atravesar las barreras hemato-encefálica y hemato-raquídea, lo que potencia sus efectos biológicos.^(34,35) El AL es un medicamento seguro con pocos y bien documentados efectos adversos que ha sido usado en el tratamiento de cáncer de próstata, endometriosis, fibrosis uterina, fertilización in vitro, pubertad precoz y, recientemente, en lesión aguda y crónica de la médula espinal.^(33,36,37)

Con base en la magnitud y trascendencia de las condiciones causantes de ceguera y baja visión; su naturaleza y factores relacionados; y los antecedentes expuestos anteriormente, este trabajo intenta responder a la siguiente pregunta de investigación:

Pregunta de investigación

¿Cuál es el efecto del acetato de leuprolida, un análogo sintético de la GnRH, en la lesión de retina y nervio óptico de rata?



Justificación

Importancia y actualidad

El SNC humano se ha distinguido históricamente por su limitada capacidad regenerativa que se reduce drásticamente después del nacimiento y al paso del tiempo. La retina y el nervio óptico son elementos constitutivos del SNC y se cree que su pobre capacidad de reemplazo del tejido dañado o regeneración obedece a los mismos factores restrictivos que el SNC. ⁽²⁵⁾ El reto preponderante actual es restablecer la visión o al menos algo de ella. Durante el siglo pasado se consideraba que la posibilidad era escasa, sin embargo, en las últimas tres décadas ha habido avances importantes en este sentido. Actualmente varios centros de investigación alrededor del mundo investigan el efecto de la terapia génica y epigenética, trasplante de células y tejidos, sustancias promotoras del crecimiento neuronal, agentes proinflamatorios y el desarrollo de dispositivos electrónicos, ópticos y no-ópticos para el manejo de las enfermedades causantes de ceguera y baja visión. Aunque el panorama es prometedor, aún hay varios obstáculos por vencer en el camino. Además de revertir el proceso de degeneración o reemplazar el tejido dañado, se debe lograr la conexión específica de las neuronas correctas con los destinos correctos en las diferentes estructuras que conforman la vía visual central como el núcleo geniculado lateral y los núcleos pulvinares del tálamo, la corteza cerebral, los núcleos hipotalámicos, los colículos superiores del mesencéfalo, el complejo pretectal y el sistema óptico accesorio. No solo eso, sino que además deben hacerlo retinotópicamente, es decir, en un arreglo de conexiones específicas que permita una representación espacial, temporal y cromática coherente que finalmente permita reproducir con fidelidad las características físicas, espaciales y temporales de los estímulos visuales en el medio ambiente. De igual manera, modular la importante respuesta glial en el proceso

degenerativo, lograr la mielinización de las fibras y generar un microambiente celular que permita la sobrevivencia del tejido a largo plazo son desafíos cruciales que requieren una delicada estabilidad fisiológica producto de procesos alostáticos complejos.⁽²⁵⁾

Aporte

Este estudio se basa en el tratamiento a base AL, un factor neurotrófico que ha demostrado tener propiedades regenerativas en el SNC y simultáneamente posee un efecto modulador de la respuesta glial. Recientemente se ha documentado la presencia de receptores celulares para la GnRH en tejidos oculares de invertebrados, mamíferos y humanos. Si se logra demostrar que el AL tiene efectos oculares semejantes a los que ha mostrado tener en el SNC, en el futuro será posible desarrollar una línea de investigación para conducir estudios más profundos y precisos que aporten información sustancial en el campo de la regeneración de la retina y nervio óptico, constituyendo una posible nueva alternativa en el manejo de las enfermedades causantes de ceguera y baja visión.

Accesibilidad

Para el estudio se cuenta con la infraestructura y el capital humano mínimo necesarios para efectuar los análisis funcionales, morfométricos y bioquímicos que lleven a alcanzar los objetivos propuestos.

Referentes teóricos y contextuales

Organización del sistema nervioso central

La neurona

El sistema nervioso central (SNC), comprende aproximadamente 100,000 millones de neuronas que emiten señales a través de conexiones sinápticas. Según sus funciones se pueden clasificar en tres tipos:

Sensoriales: obtienen información sobre lo que está sucediendo dentro y fuera del cuerpo, y la llevan hacia el SNC para que se pueda procesar.

Neuronas motoras: estas obtienen información de otras neuronas y transmiten órdenes a tus músculos, órganos y glándulas.

Interneuronas: solo se encuentran en el SNC, conectan una neurona con otra. Este tipo de neuronas recibe información de otras neuronas (ya sean sensoriales o interneuronas) y transmiten la información a otras neuronas (ya sean motoras o interneuronas). ⁽³¹⁾

Receptores sensitivos

Toda respuesta del SNC se desencadena con ayuda de los receptores de los diversos sistemas sensoriales. Estas respuestas vienen dirigidas desde el encéfalo y con ello almacenarse por un tiempo determinado para ser usado en algún momento de la vida. Son terminaciones nerviosas o células especializadas capaces de captar estímulos internos o externos y generar en respuesta impulsos nerviosos.

La información que llega al SNC es procedente de los nervios periféricos y se traslada hacia zonas como: 1) médula espinal, 2) bulbo raquídeo,

protuberancia y mesencéfalo, 3) cerebelo, 4) tálamo y 5) áreas de la corteza cerebral. ⁽³¹⁾

Procesamiento de la información

El SNC elabora respuestas ante el estímulo presente, sin embargo, el 99% de la información procedente de los receptores es descartada de acuerdo con los niveles de interés o importancia. Cuando la información es seleccionada, inmediatamente se envían señales hacia regiones motoras e integradoras para que se susciten respuestas oportunas y correctas. ⁽³¹⁾

Niveles de función del SNC

Nivel medular

El nivel medular (aunque mucho lo consideran como un mero conductor) tiene múltiples funciones dotadas de una gran organización, aunque, es el nivel más burdo es el único que opera con reflejos de diferentes tipos como: dolor, gravedad, micción, peristalsis, entre otros. La información se dirige a los centros de control de la medula y de ahí, se deriva la ejecución de funciones. ⁽³¹⁾

Nivel encefálico inferior o subcortical

Este nivel regula la presión arterial y la respiración sin intervención de la conciencia. Las regiones o estructuras inferiores son las que integran el nivel (bulbo raquídeo, protuberancia, mesencéfalo, hipotálamo, tálamo, cerebelo y ganglios basales).

Otra función (aunque combinada) es el control del equilibrio, los reflejos de alimentación, patrones emocionales, reacciones al dolor y al placer.

Nivel encefálico superior o cortical

Este nivel es el más complejo, ya que actúa en función a los niveles antes mencionados. El nivel cortical es un inmenso cumulo de información que, suele convertirse en funciones determinadas y precisas.⁽³¹⁾

Sinapsis del SNC

Llamados también impulsos nerviosos son los encargados de pasar información de una neurona a otra en una sucesión o reacción en cadena.

Sinapsis químicas.

En este tipo de cadenas de impulsos el factor más importante es un producto químico que se segrega en el SNC, es decir, un neurotransmisor. Esta sustancia actúa como desencadenante a una reacción ya sea para inhibir, excitar o modificar su sensibilidad de alguna forma. Entre las sustancias químicas más conocidas están: acetilcolina, noradrenalina, adrenalina, histamina, GABA, glicina, serotonina, glutamato, entre otras.

Sinapsis eléctricas.

En estas conexiones los citoplasmas de las células están conectados a un grupo de canales iónicos también llamados uniones en hendidura. Estos canales se cierran y se abren de acuerdo con las cargas iónicas con ello, se realizan los potenciales de acción para emitir respuesta a un estímulo determinado.⁽³¹⁾

Receptores sensitivos

Tipos de receptores sensitivos

La clasificación muestra cinco tipos básicos de receptores:

Mecanorreceptores: detectan la presión mecánica propia o de tejidos circundantes.

Termorreceptores: identifican los cambios de temperatura.

Nocirreceptores: manifiestan daños físicos o químicos, se les nombre receptores del dolor.

Receptores electromagnéticos: detectan la luz en retina.

Quimiorreceptores: identifican el gusto, olfato, cantidad de oxígeno y otros receptores para completar la bioquímica del organismo.

Estos receptores se ocupan de diversas sensaciones muy específicas con ayuda de los diferenciadores que cada uno tiene. Cada uno de los principales receptores tienen modalidad de sensación, esto nos ayuda a que el SNC detecte cada una de diferente manera ya que llegan a zonas específicas y por lo tanto estimulan zonas distintas.

Los receptores tienen algo en común, el potencial de receptor. Existen cuatro mecanismos para excitar a los recetores: 1) mecánica, 2) química, 3) térmica y 4) radiación electromagnética. En cualquier tipo lo que se crea es una permeabilidad de la membrana y el paso iónico de sustancias al interior donde crea la respuesta.

Sin embargo, los receptores tienen una característica particular, la adaptación. Es decir, cuando un estímulo excita durante un tiempo prolongado al receptor este entra en un estado de reposo o meseta en el cual ya no se registra

estimulación y por lo tanto tampoco respuesta. Por ejemplo, en el ojo los conos y bastones se adaptan al modificarse las concentraciones químicas sensibles a la luz. ⁽³¹⁾

El ojo

El ojo es un órgano receptor capaz de transmitir y convertir luz en electricidad. De ahí, se desprenden un sinnúmero de experiencias creadas por la visión. Sin embargo, para poder entender la visión y el ojo es necesario conocer sus características.⁽¹⁹⁾

Óptica de la visión

El ojo casi siempre es comparado con el funcionamiento de una cámara fotográfica, sin embargo, es mucho más complejo que eso. El sistema ocular posee cuatro superficies de refracción: 1) córnea, 2) humor acuoso, 3) cristalino y 4) humor vítreo las cuales tienen un poder dióptrico que le da el valor total al globo ocular. De la misma manera que un vidrio es capaz de tener foco y formar una imagen en algún papel así el sistema ocular con ayuda de las superficies enfoca la imagen sobre la retina. Sin embargo, aunque la percepción de los objetos sea derecha su orientación es al revés debido a que para el cerebro es normal identificar una imagen invertida. Existen diversas anomalías o disfunciones presentes en el funcionamiento óptico de la óptica del ojo, los más comunes y conocidos son los errores de refracción. Esto conlleva a mala calidad de la visión e incluso en cambios internos y estructurales del globo ocular.^(19,31)

Sistema humoral del ojo

El ojo está colmado de líquido intraocular que ayuda a mantener la forma del globo ocular. Estos líquidos intraoculares se dividen en humor acuoso y humor vítreo. El humor acuoso se forma en el ojo a una velocidad de 2 a 3ml/min con ayuda de los procesos ciliares que salen del cuerpo ciliar hacia el espacio que queda atrás del iris donde se fijan los ligamentos del cristalino. El humor acuoso viaja de manera libre por la cámara anterior (superficie posterior de la córnea hasta superficie anterior del cristalino) cuya principal función es nutrir y oxigenar las estructuras del globo ocular que no tienen aporte sanguíneo. En condiciones normales el humor acuoso se renueva cada 90 minutos siguiendo toda una ruta de salida que va desde el ángulo que forma la córnea y el iris pasando por la malla trabecular y finalmente entrando al conducto de Schlemm que desemboca en las venas extraoculares. El humor vítreo o también llamado cuerpo vítreo por su consistencia, es una masa gelatinosa compuesta por proteoglicanos su función es dar volumen al ojo, pero sobre todo sostener la retina y dar transparencia para que la luz pase de manera normal. ^(19, 31)

Presión intraocular

La presión intraocular (PIO) es la medida de cuánta presión ejercen los líquidos intraoculares para mantener la forma ideal, lo normal es tener 15mmHg con un intervalo desde 12-20 mmHg. La PIO permanece constante debido al flujo continuo del humor acuoso, pero, cuando la cantidad de partículas es mayor a lo habitual o a lo que se considera normal, el acúmulo y cantidad ya no puede fluir de una manera adecuada y por lo tanto el paso al canal de Schlemm no se realiza. Inmediatamente la PIO comienza a ascender saliendo de valores normales y dañando internamente al ojo lo que puede causar deterioro y mal funcionamiento estructural. Existen múltiples enfermedades provocadas por el aumento de la PIO, sin embargo, el más común es el glaucoma. Esta enfermedad es la mayor causante de ceguera, es una enfermedad ocular en la que la presión sube a niveles patológicos registrándose incluso hasta

60mmHg. Las presiones o mediciones por encima de 25mmHg pueden provocar pérdidas de visión. La presión elevada hace que los axones del nervio óptico queden comprimidos en la salida del globo ocular. Se cree que la compresión bloque el flujo axónico del citoplasma desde las somas situadas en la retina hacia las fibras del nervio óptico que se dirigen al cerebro. Lo que resulta en una ausencia de nutrición para las fibras y la muerte y/o daño neuronal importante. En el caso del glaucoma el único tratamiento que se sigue es el control de la PIO y la adaptación a la calidad de vida de las personas en condiciones de baja visión.⁽¹⁹⁾

Funciones receptoras y nerviosas de la retina

Anatomía y función de los elementos estructurales de la retina

Las capas de la retina se disponen de la siguiente manera:

- 1) Epitelio pigmentario
- 2) Fotorreceptores (conos y bastones)
- 3) Limitante externa
- 4) Nuclear externa
- 5) Plexiforme externa
- 6) Nuclear interna
- 7) Plexiforme interna
- 8) Ganglionar
- 9) Fibras del nervio óptico
- 10) Limitante interna.

La papila óptica o punto ciego es una zona circular situada en el centro de la retina (la cabeza del nervio óptico), donde se agrupan todas las prolongaciones de las neuronas para llevar el impulso hacia el cerebro. Carece de sensibilidad a los estímulos luminosos al carecer de conos y bastones. La

arteria y las venas de la retina son las encargadas de nutrir las capas más internas de la retina. La mácula es la parte más importante de la retina ya que nos permite ver con la máxima agudeza visual. Se trata de una pequeña área situada justo en el centro de la retina, por lo que es la encargada de nuestra visión central pero también de la visión en detalle y en movimiento. Gracias a la mácula es posible distinguir las caras, los colores y los objetos más pequeños. Esto se produce porque en la zona donde tenemos mayor concentración de conos y se encuentra precisamente en la fóvea. La fóvea es una región específica de la retina donde se encuentra y se concentra un mayor número de fotorreceptores que poseen una estructura especial para detectar detalles en la escena visual. Así mismo, en esta región los vasos sanguíneos, las células ganglionares, la capa nuclear interna y las plexiformes quedan desplazados hacia un lado en vez de apoyarse directamente sobre la parte superior de los conos, lo que permite que la luz llegue hasta estos sin ningún impedimento. La retina periférica es la que permite la visión a nuestro alrededor. Es decir, si alguien nos observa fuera de nuestro foco central de visión, esta parte de la retina nos permite reconocer la forma y silueta gracias a este campo de visión periférica. ⁽¹⁹⁾

Fotoquímica de la visión

Los fotorreceptores son los encargados de detectar la luz, colores, tonalidades tenues y básicamente la visión en blanco y negro. Ambos fotorreceptores (conos y bastones) contienen producto químico que se descompone ante la entrada de luz. La rodopsina es la sustancia sensible a los bastones, mientras que los pigmentos de color pertenecen a los conos, ambas sustancias se aplican del mismo modo. El extremo del bastón se desenvuelve hasta el epitelio pigmentario, lo que hace más fácil de captar la luz. Cuando la rodopsina entra en juego absorbe toda la energía procedente de la luz, la empieza a descomponer en cuestión de segundos ya que, desemboca al pigmento

carotenoide retinal que tiene un tipo especializado llamado 11-cis-retinal para sintetizar de una forma rápida y efectiva. Al desplegarse pasa de cis a todo-trans para que la orientación cambie a la proteína escotópica. ⁽¹⁹⁾

Cuando los bastones se encuentran expuestos a energía lumínica aumento la carga negativa en el potencial de membrana lo que supone un estado de hiperpolarización, es decir, lo contrario al proceso de despolarización que normalmente pasa en los receptores sensitivos. La razón por la que sucede de manera inversa es que la rodopsina cuando se descompone disminuye la conductancia de la membrana para los iones sodio en su segmento externo provocando la hiperpolarización. Por otro lado, los conos tienen la capacidad de integrar el retinal con la fopsina para que la sensibilidad al color sea más exacta. Los pigmentos presentes son al azul, verde y rojo, teniendo características de absorción dependiendo de las longitudes de onda 445 nm para el azul, 535 nm para el verde y 570 nm para el rojo. ⁽¹⁹⁾

Adaptación a la luz y a la oscuridad

La adaptación a la luz es un fenómeno importante, cuando un ojo está expuesto a una luz constante durante un tiempo prolongado una gran parte de las sustancias químicas se reducirán al grado de retinal. La sensibilidad se ve reducida por la excitación constante del estímulo, así que se adapta a la luz. Por el contrario, si un ojo permanece en total oscuridad durante un tiempo determinado el retinal en combinación con la opsina no pueden desencadenar el potencial adecuado dando paso a la adaptación del medio ambiente en el que se está desarrollando la visión, es decir, adaptación a la oscuridad. ⁽¹⁹⁾

La recepción de imágenes en la retina requiere la detección de puntos luminosos y de oscuridad en una escena visual, resulta fundamental que su sensibilidad este siempre ajustándose de modo que los receptores respondan a las zonas de interés ya sea luminosa u oscura. Entre los límites de adaptación tanto a la luz como a la oscuridad, el ojo puede modificarse hasta

1 millón de veces, con ayuda de una corrección automática ante los cambios lumínicos. ⁽¹⁹⁾

Funciones nerviosas de la retina

Para tener conexiones nerviosas estables se requiere de todo un circuito neuronal que contienen:

Fotorreceptores que transmiten las señales hacia la capa plexiforme externa, donde hacen sinapsis con células bipolares y horizontales.

Las células horizontales transmiten información desde los fotorreceptores hasta las bipolares.

Las células bipolares hacen sinapsis con las células ganglionares y amácrinas con ayuda de las horizontales pasando por la plexiforme interna de manera vertical.

Las amácrinas fungen de manera local llevando información tanto de bipolares a ganglionares y de horizontales a bipolares.

Las células ganglionares transmiten señales de salida desde la retina hasta el cerebro por medio del nervio óptico.

La célula interplexiforme transmite señales en sentido retrogrado para inhibir y controlar la dispersión de los impulsos dados por las demás células.

Las células ganglionares son el punto de origen de las fibras que salen del nervio óptico y llegan al cerebro. La conducción se debe a un sinfín de potenciales de acción, incluso cuando no están estimuladas envían impulsos nerviosos rápidos en su inicio y lentos al final. ⁽¹⁹⁾

Neurofisiología central de la visión

Vías visuales

Las principales vías de visión resultan desde los impulsos eléctricos que van de la retina pasando a través de los nervios ópticos, de ahí, van directamente hacia el quiasma óptico haciendo un cruce de fibras de la retina nasal del ojo derecho se junta con la retina temporal del ojo izquierdo así mismo, la retina temporal del ojo derecho se conecta con la retina nasal del ojo izquierdo hacia el lado opuesto donde se forman las cintillas ópticas o también llamados tractos ópticos. Las fibras de las cintillas hacen sinapsis en el núcleo geniculado lateral dorsal del tálamo, cuando la información es intercambiada en ese sitio las fibras genículo-calcarinas se dirigen a las radiaciones ópticas enfilándose a la corteza visual primaria en el área que le corresponde. ^(19,31)

Función de la corteza visual

La corteza visual está constituida por la corteza visual primaria y áreas visuales secundarias. La corteza visual primaria también llama V1 se halla en el área de cisura calcarina se extiende desde el polo occipital hacia delante por la cara medial de cada corteza occipital. Esta área alberga a las señales visuales procedentes de ambos ojos. Las que se originan en la macula acaban cerca del polo occipital mientras que las de la retina periférica finalizan por delante del polo, pero todavía sin abandonar la cisura calcarina en el lóbulo occipital medial. La fovea es la responsable de los niveles más altos de agudeza visual así que en la corteza representa un número mayor que la retina periférica.

La corteza visual primaria está dividida dentro de seis capas funcionales, etiquetadas de 1 al 6 (I-VI). La capa 4, la cual recibe la mayor entrada de señal visual del núcleo geniculado lateral, está también dividida en 4 capas, etiquetadas como 4A, 4B, 4C α , y 4C β . La sub-lámina 4C α recibe una buena parte de la entrada magnocelular proveniente del núcleo geniculado lateral mientras que la capa 4C β recibe la entrada proveniente de la vía parvocelular.

V1 tiene un mapa muy bien definido de la información espacial en visión. En los humanos el banco superior de la cisura calcarina responde fuertemente a la mitad baja del campo visual (por debajo del centro), y el banco inferior de la cisura responde a la mitad superior del campo visual. Conceptualmente ésta retinotopía (que describe la organización espacial de las respuestas neuronales) es una transformación de la imagen visual de la retina en V1. La correspondencia entre una locación dada en V1 y en el subjetivo campo visual es muy precisa: incluso los puntos ciegos están mapeados dentro de V1. En los humanos y los animales con una fovea en la retina, una gran porción de V1 esta mapeada en la pequeña porción central del campo visual, un fenómeno conocido como magnificación cortical. Quizás con el propósito de lograr una codificación espacial minuciosa, las neuronas en V1 tienen el campo receptivo más pequeño que cualquier región microscópica de la corteza visual. ^(19,31)

Las áreas visuales secundarias también llamadas áreas de asociación ocupan las zonas laterales, anteriores, superiores e inferiores a la corteza visual primaria. Las áreas de asociación reciben impulsos con el fin de analizar los significados de la escena visual. El área 18 de Brodmann o llamada V2 es el lugar donde llegan toda la información para ser decodifica, las demás áreas secundarias denominadas V3, V4, etc., hasta llegar a V12. Lo importante es que todas ellas van diseccionando y analizando progresivamente los diversos aspectos de la imagen visual. ^(19,31)

Análisis de la información visual

La información entrante se analiza por dos vías principales de las áreas de asociación:

Vía rápida de la posición y el movimiento

Esta vía explora la forma básica global de la escena visual, así como el movimiento que produce, es decir, donde este cada objeto en cada instante y si está en movimiento o no. Después de salir de la corteza visual primaria, los impulsos viajan en general hacia el área temporal media posterior y ascienden hacia la corteza occipitoparietal. En el borde anterior de la corteza parietal se superponen con los que proceden de las áreas de asociación somáticas posteriores dedicadas a analizar los aspectos tridimensionales de las señales somatosensitivas. La información encargada de la posición forma y movimiento básicamente vienen en fibras grandes del nervio óptico y transmiten impulsos rápidos, pero únicamente en blanco y negro. ^(19,31)

Vía de la exactitud al color

Esta vía es muy hábil para analizar es especificidades del color, se ocupa de identificar trazos (letras), lectura, determinar texturas de los objetos, colores detallados, descifrar lo que es y lo que significa un objeto a partir de toda la información.

Patrones neuronales de estímulos durante el análisis de una imagen visual.

Análisis de los contrastes en la imagen. Las señales de la corteza visual se ocupan sobre todo de los contrastes en la escena visual, más que de regiones no contrastadas.

Las células simples. La corteza visual solo detecta la existencia de líneas y bordes en las diferentes zonas de la imagen retiniana, sino también en la que se están orientadas cada una de ellas, es decir, si son verticales u horizontales

o si guardan un cierto grado de inclinación. Se cree que esta capacidad obedece a la excitación de neuronas que inhiben mutuamente.

Las células complejas. A medida que la señal disminuye su intensidad de las áreas de asociación las conexiones también lo hacen, sin embargo, estas células (escasas o en menor número) seguirán activadas.

En condiciones normales, los astrocitos confieren estabilidad mecánica a los tejidos y se involucran importantemente en los procesos homeostáticos. Se encuentran formando parte de la barrera hematorretiniana y junto con la microglía, los oligodendrocitos y las células epiteliales de la pared vascular organizan unidades neurovasculares, una pieza clave en el acople nervioso-vascular. También absorben iones locales de potasio y cloro y moderan la concentración de agua y con ello el pH extracelular. Los astrocitos evitan altas concentraciones de neurotransmisores como el glutamato, que ha demostrado tener un efecto citotóxico importante, por ello los tejidos implementan diversos mecanismos para el control de su concentración.

Las células de Müller se orientan de manera radial en la retina y se extienden prácticamente en todo su espesor, participan del ciclo visual de los fotorreceptores, regulan la concentración de potasio, hidrógeno, neurotransmisores, glutamato y GABA en el espacio extracelular.

Las células de la microglía forman parte de los mecanismos de control del glutamato, estas células están involucradas en la actividad de la glutamina sintetasa, una enzima catalizadora de glutamato. La microglía también es sensible a la concentración del potasio y durante la lesión pueden desencadenar una liberación masiva de radicales de oxígeno en el tejido.

Por otro lado, los oligodendrocitos tienen un abundante componente lipídico, el 70% de su peso son lípidos y el 30% restante lo representan proteínas enriquecidas con esfingolípidos como la galactosa, la ceramida y la sulfamida. Los oligodendrocitos se encargan de la mielinización neuronal. Agrupan a varias fibras nerviosas regulando la propagación y sincronización de señales

eléctricas, además brindan soporte estructural y tienen función trófica. Son altamente sensibles a la isquemia, el trauma y la inflamación. Su muerte masiva provoca esclerosis múltiple, déficit motor, esquizofrenia y ceguera, entre otras. En caso de lesión, las células progenitoras migran transitoriamente, se diferencian en oligodendrocitos y favorecen la mielinización que forma parte del fenómeno de recuperación espontánea y pasajera. ^(19,31)



Metodología

Objetivos

Objetivo general

Determinar el efecto del acetato de leuprolida en la lesión de retina y nervio óptico de rata.

Objetivos específicos

1. Identificar los rangos normales de presión intraocular en los sujetos de estudio.
2. Estandarizar el modelo experimental de glaucoma inducido en rata.
3. Medir la amplitud basal de la onda a-b y la relación b-a en el eletrorretinograma de los sujetos que conforman la muestra total.
4. Inducir glaucoma experimental en los sujetos de los grupos 2 y 3 mediante AH/HPMC.
5. Evaluar el efecto del tratamiento con AH/HPMC en la amplitud de la onda a-b y la relación b-a en el eletrorretinograma de los sujetos que conforman los grupos de estudio 2 y 3.
6. Administrar el tratamiento con AL a los sujetos que conforman el grupo de estudio 3.
7. Evaluar el efecto del tratamiento con AL en la amplitud de la onda a-b y la relación b-a en el eletrorretinograma de los sujetos que conforman el grupo de estudio 3.
8. Determinar el efecto del acetato de leuprolida en la lesión de retina y nervio óptico mediante análisis histológico.

Diseño metodológico

Tipo de estudio	
Criterio	Tipo
Ocurrencia y registro	Prospectivo
Periodo y secuencia	Longitudinal
Control de variables	Serie cronológica experimental
Análisis y alcance	Analítico, experimental
Tipo de hipótesis de trabajo	Hipótesis simple de diferencia de grupos
Muestreo	No aleatorio
Tamaño de muestra	60 ojos / 30 ratas
Tema	Regeneración neuronal
Objeto de estudio	Efecto del acetato de leuprolida en la lesión de retina y nervio óptico
Sujeto de estudio	Rata albina wistar macho
Criterios de inclusión	Animales sanos de 270-300 gramos de peso promedio
Criterios de exclusión	Animales con enfermedad ocular, sistémica o fuera del rango de peso establecido.
Criterios de eliminación	Muerte o enfermedad ocular o sistémica adquirida durante el periodo de estudio.

Tabla 1. Diseño metodológico.

Conceptualización de variables

Variable	Definición	Dimensión	Técnica	Indicador
Presión Intraocular	Presión de los fluidos y tejidos internos del ojo.	Biológica	Tonometría de rebote	mmHg
Amplitud de la onda a-b	Distancia pico a pico entre las curvas a y b del ERG.	Biológica	Electrorretinograma simultáneo de campo completo	Microvolts (μV)
Relación b-a	Resultado de la división de la amplitud de la onda b por la amplitud de la onda a	Biológica	Electrorretinograma simultáneo de campo completo	Microvolts (μV)

Tabla 2. Conceptualización de variables.

Sistema de hipótesis

Hipótesis de investigación (Hi): El acetato de leuprolida mejora significativamente la recuperación estructural y funcional en la lesión de retina y nervio óptico de rata.

Hipótesis nula (H0): El acetato de leuprolida no mejora significativamente la recuperación estructural y funcional en la lesión de retina y nervio óptico de rata.

Hipótesis alternativa (Ha): El acetato de leuprolida no tiene ningún efecto en la lesión de retina y nervio óptico de rata.

Procedimientos y equipo

Animales

En este estudio se utilizaron ratas Wistar macho (n=30) de 10 semanas de edad con un peso de 270 a 300 g, se alojaron en una habitación con temperatura (25°±2° C) y luz controlada (ciclo de luz/oscuridad de 12 horas) con suministro *ad libitum* de alimentos y agua. Todos los animales fueron orquiectomizados para evitar el posible efecto neuroprotector de las hormonas sexuales ya que el acetato de leuprolida puede inducir un aumento de estas hormonas. Las ratas se dividieron en tres grupos: 1) grupo de control, que se sometió a cirugía simulada (n = 10), 2) glaucoma no tratado (n = 10), inyectado en la cámara anterior con ácido hialurónico e hipromelosa (HA/HPMC), y 3) Glaucoma tratado (n=10), inyectado en cámara anterior con ácido hialurónico, hipromelosa y acetato de leuprolida intramuscular (HA/HPMC+LA). Por consideraciones éticas, los animales fueron manejados de acuerdo con las Especificaciones Técnicas para la Producción, Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT, 2011), y el Reglamento Institucional de Bienestar Animal de la Universidad Autónoma de Aguascalientes.

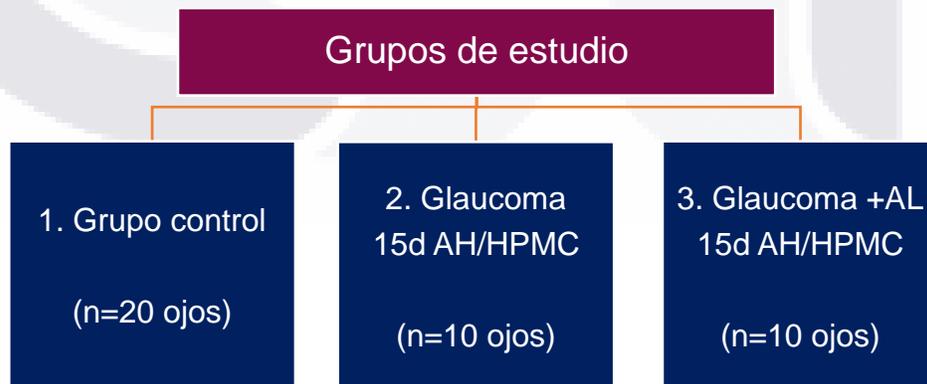


Imagen 1. Distribución de los grupos de estudio.

Cronología de experimentos

1. Las ratas fueron sometidas a orquidectomía y estuvieron en recuperación y observación por un periodo de dos semanas antes de iniciar los experimentos.
2. En el día 'cero' se realizó el registro electroretinográfico basal (T1) para tener un punto de referencia acerca de la suma de las respuestas eléctricas generadas por los diferentes tipos celulares que componen la retina a la estimulación luminosa previo al desarrollo del resto de los experimentos.
3. El día 1 comenzó el tratamiento con AH/HPMC (inducción de glaucoma experimental) por un periodo de 2 semanas. Las inyecciones intracamerales de AH/HPMC se aplicaron cada 96 horas, es decir, los días 1, 4, 8, 12.
4. El día 15 se realizó nuevamente un registro electroretinográfico (T2) para conocer el efecto del tratamiento con AH/HPMC en la respuesta eléctrica de la retina a la estimulación luminosa.
5. Durante dos semanas más no se condujo experimento alguno considerando el periodo de recuperación espontánea después de la lesión. (26,27)
6. El día 30, antes de iniciar tratamiento con AL, se realizó un registro electroretinográfico (T3) para conocer la respuesta eléctrica de la retina a la estimulación luminosa después del periodo de recuperación espontánea.
7. El día 31 se inició el tratamiento con AL, las inyecciones intramusculares se aplicaron cada 72 horas por cuatro semanas continuas.
8. El día 60 se realizó un registro electroretinográfico (T4) para conocer el efecto del tratamiento con AL en la respuesta eléctrica de la retina a la estimulación luminosa.

- 9. Durante dos semanas más no se condujo experimento alguno.
- 10. El día 75 se realizó un registro electroretinográfico (T5) para conocer la respuesta eléctrica de la retina a la estimulación luminosa después de suspender el tratamiento con AL.
- 11. Finalmente, se inició la preparación de tejidos para estudios histológicos y bioquímicos.

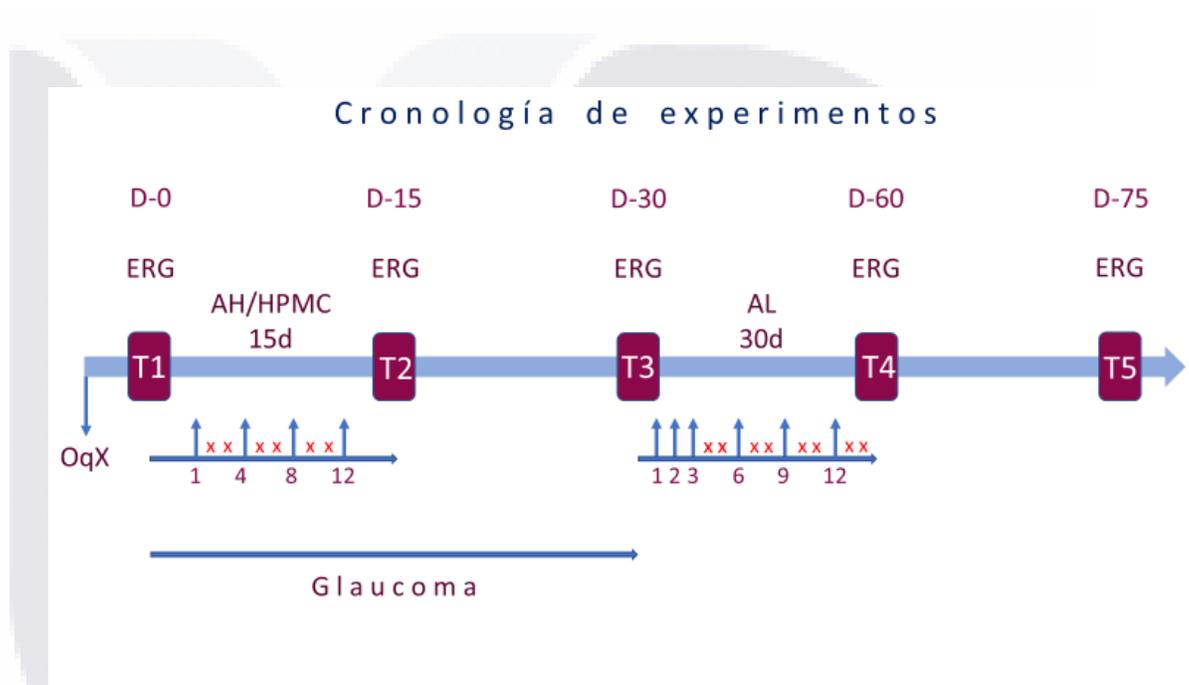


Imagen 2. Cronología de experimentos.

Tratamientos

Los ojos derechos de los grupos 2 y 3 fueron tratados con inyección intracameral de HA/HPMC cada 96 horas por un periodo de 2 semanas para inducir glaucoma, los ojos izquierdos fueron usados como control. La presión intraocular se controló mediante tonometría de rebote y las respuestas eléctricas se registraron mediante electroretinografía de flash simultánea de campo completo. En las dos semanas siguientes no se administró tratamiento y a partir de la quinta semana se administró acetato de leuprolida intramuscular (10 mg/kg, cada 3 días) durante cuatro semanas más (grupo 3). Los ojos

fueron enucleados dos semanas después de finalizado el tratamiento con acetato de leuprolida y procesados para estudio histológico de retina y nervio óptico.

Anestesia

La anestesia quirúrgica se indujo mediante la administración intraperitoneal de pentobarbital sódico a la dosis de 40 mg/kg y la anestesia ocular se realizó instilando gotas de solución oftálmica de clorhidrato de tetracaína (0,5%).

Orquidectomía

Indicaciones preoperatorias

1. En el instrumento de recolección de datos se registra la fecha de cirugía, identificación, grupo de estudio, cepa, sexo y peso corporal.
2. Todo material que estará en contacto con los tejidos se lava con agua y jabón y se limpia con gasa estéril humedecida con alcohol al 70% entre cada cirugía.
3. Antes de iniciar la cirugía se procede a numerar al animal con el perforador de orejas, se rasura la parte ventral de la piel del escroto y se limpia con solución antiséptica.
4. Se coloca sobre la mesa de operaciones en decúbito dorsal, sujetando la cabeza con la horquilla para incisivos. Con los hilos se atan las patas, extendiéndolas sobre la mesa y sujetándolas a las rondanas localizadas alrededor de la mesa.

Procedimiento

1. Con las tijeras y la pinza de disección con dientes

2. Se hace un corte en la parte media-distal de la línea media de la piel del escroto de 1-1.5 cm de longitud. Al abrir la piel, por transparencia se observan los testículos, cada uno en su propio saco escrotal.
3. Para exponer el testículo, con la pinza de disección con dientes se sujeta a la túnica albugínea y se cortan en una longitud de 1 cm aproximadamente.
4. Haciendo un poco de presión sobre la parte baja del abdomen, se exterioriza el testículo, el epidídimo y parte del conducto deferente. Se levantan dichas estructuras y se pasa una ligadura que incluye al conducto deferente y los vasos sanguíneos epididimarios apretándola fuertemente.
5. Se corta entre la ligadura y el testículo, epidídimo y conducto deferente. Se colocan las estructuras sobre una gasa y se procede a extirpar el testículo del lado opuesto.
6. Se revisa que no haya sangrado, se regresan los tejidos remanentes al saco escrotal y se procede a suturar la piel.

Indicaciones posoperatorias

Se coloca la rata dentro de la cámara de recuperación sobre el colchón térmico. Se le inyectaran 10 UI de penicilina intramuscular durante 3 días. Una vez que se recuperan del procedimiento se pasan a su jaula nuevamente.

Instrumental	Material
Tijera Mayo recta	Mesa de cirugía
Pinza de disección fina	Rasuradora
Porta agujas	Perforador de orejas
Aguja de sutura	Hilo para suturar
	Hilos para ligar vasos y conducto deferente
	Antibiótico tópico
	Jeringa de 1ml
	Cámara de recuperación
	Colchón térmico
	Hilos para patas
	Atomizador con alcohol al 70%
	Pentobarbital sódico 6.3/100ml
	Lubricante ocular

Tabla 3. Lista de instrumentos y materiales para orquidectomía.

Tonometría

Procedimiento

1. Inducir anestesia superficial por administración intraperitoneal de pentobarbital sódico (6.3gr/100ml) a temperatura ambiente y a dosis de 30mg/kg.
2. Se coloca la rata en decúbito ventral sobre la mesa de trabajo.
3. Durante la medición el tonómetro debe estar alineado horizontalmente y situado perpendicularmente respecto al ápice corneal, la distancia de la sonda de contacto a la córnea debe ser de entre 4-8mm, el tonómetro puede ser rotado los 360 grados siempre y cuando se mantengan las condiciones anteriores.

4. Se enciende el tonómetro presionando el botón de inicio y se inserta la sonda en la base, el campo magnético que sostiene la sonda se activa presionando nuevamente el botón de inicio.
5. Se procede a la medición una vez que la pantalla muestra el valor "00", se aproxima el instrumento al ojo y se presiona el botón de inicio en 6 ocasiones para obtener un valor promedio de la PIO.
6. El sexto registro corresponde al promedio de 4 de los cinco valores previos, el sistema elimina automáticamente el valor más bajo.
7. Junto con el resultado final, en la pantalla se muestra la desviación estándar de las lecturas mediante una letra parpadeante y una línea lateral. Cuando la letra no parpadea y no se muestra la línea lateral, significa que la desviación estándar es menor a 1.8 mmHg; cuando la letra parpadea y aparece una línea lateral inferior significa que la desviación se encuentra entre 1.8 a 2.5 mmHg; cuando la letra parpadea y se muestra una línea lateral intermedia, significa que la desviación se encuentra entre 2.5 a 3.5 mmHg; cuando la letra parpadea y se muestra una línea lateral superior significa que la desviación es mayor de 3.5 mmHg.
8. El procedimiento se realiza cuidadosamente ya que la PIO puede cambiar por efecto del pulso, la respiración, el movimiento ocular, la posición corporal y maniobras de defensa propias del animal. Se realizó limpieza semanal del dispositivo mediante agua destilada y aire presurizado.

Instrumental	Material
Tonómetro veterinario de rebote Icare Tonovet	Pentobarbital sódico 6.3/100ml
Sondas metálicas	Jeringa 1ml
	Guantes de látex
	Guantes de algodón
	Mesa de cirugía
	Báscula
	Cámara de recuperación
	Colchón térmico

Tabla 4. Lista de instrumentos y materiales para tonometría.

Electrorretinograma

Procedimiento

Configuración del canal de registro

Previo al registro del f-ERG es necesario configurar adecuadamente los canales de registro. Se procede a ensamblar los elementos en el siguiente orden:

1. Módulos EEG100C
2. Amplificador DA100C
3. Módulo de Interfase Universal
4. Unidad de adquisición de datos MP150 (imagen 3)
5. Computadora
6. Conectar los electrodos de anillo de plata al módulo EEG100C (Vin-)

7. Conectar el cable del transformador primero al módulo MP150 (el enchufe se encuentra en la parte posterior del módulo) y luego a la toma de corriente.
8. Conectar un extremo del cable ethernet en el módulo MP150 (el enchufe se encuentra en la parte posterior del módulo) y el otro extremo al enchufe correspondiente de la computadora.
9. Utilizando el *selector de canales* localizado en la parte superior del Amplificador, seleccione el canal 1 y 2
10. Establecer la ganancia en 5000 y los filtros en 1.0 Hz, Normal, ON.
11. Encender la computadora y establecer la conexión con el sistema MP150
12. Abrir el programa *AcqKnowledge* y la ventana de MP150.
13. Seleccionar *Setup channels*, nombrar a los canales 1 ERG OD y 2 ERG OI.
14. No es necesario calibrarlos. Cerrar y pasar a MP150-*Set up acquisition*
15. Seleccionar record-append-disk, Aquisition. Sample rate 500, Total length 10 horas.
16. En la barra de herramientas seleccionar: Block de notas, cuadrícula y marcador de eventos.
17. En la barra de mediciones seleccione: P-P en una ventana y Delta-T en la otra.
18. Llevar a cabo un pre-registro para garantizar que ambos canales registren señales idénticas.
19. Proceder a realizar la preparación biológica y obtener el ERG.



Imagen 3. Ensamble del sistema de adquisición de datos.

Pre-registro

Una vez ensamblado el sistema de adquisición de datos y configurado el canal de registro se procedió a realizar un pre-registro de señales eléctricas a fin de asegurarse que ambos canales registren señales eléctricas idénticas antes de obtener los registros electroretinográficos.

1. Conectar los electrodos activos de registro y los electrodos de tierra en un extremo a las puntas de salida del estimulador electrónico y en el otro extremo a los módulos de electroencefalograma evitando en lo posible fuentes de ruido cercanas.
2. Configurar el estimulador electrónico en duración 6ms, intensidad 6v, frecuencia 1.0Hz, pulsación continua.
3. Pantalla 5seg/div, 0.1mv/div.

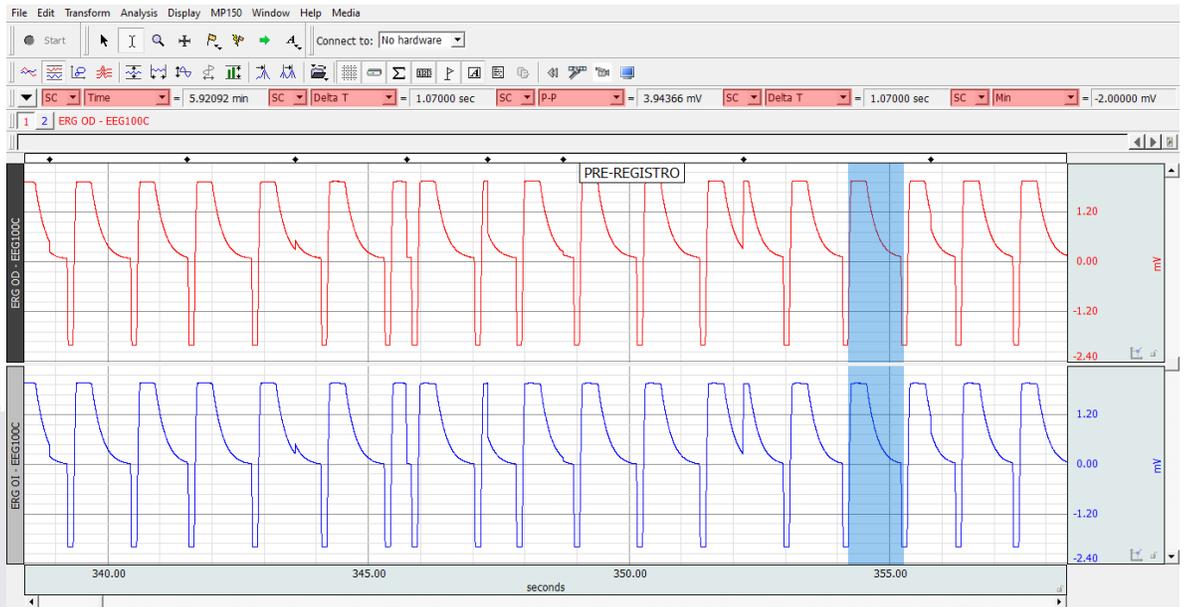


Imagen 4. Pre-registro de señales eléctricas.

Electrorretinograma simultáneo de campo completo

1. Habiendo hecho todos los ajustes previos necesarios, se procede a obtener el registro electroretinográfico en condiciones escotópicas.
2. El f-ERG se realiza por las noches a partir de las 22:00 horas para reducir en lo posible el ruido ambiental generado por la entrada y salida de personas ajenas al experimento.
3. Evitar la presencia de aparatos electrónicos no indispensables dentro del laboratorio.
4. Laboratorio en condiciones mesópicas iluminado con luz roja.
5. Evitar cualquier fuente de luz que incida directamente en los ojos de las ratas para mantener la adaptación a la oscuridad.
6. Evitar todo ruido sonoro que pueda perturbar a las ratas.

7. Se cubren todos los cables cercanos con cinta aislante para reducir el ruido ambiental.
8. El periodo de adaptación a la oscuridad es de 2 horas previo al inicio del experimento, adicionalmente se permite un tiempo adicional de 7 minutos de oscuridad total antes de iniciar el registro.
9. Inducir anestesia quirúrgica por administración intraperitoneal de pentobarbital sódico (6.3gr/100ml) a temperatura ambiente y a dosis de 40mg/kg.
10. La rata se coloca sobre la mesa de operaciones en decúbito ventral, sujetando la cabeza en el instrumento fijador estereotáxico para cabeza y teniendo especial cuidado con la lengua para evitar asfixia durante el procedimiento.
11. Fijar a la rata en la mesa de cirugía atando las cuatro patas con los hilos y sujetándolas a las rondanas localizadas alrededor de la mesa.
12. Configurar el estimulador electrónico en duración 6ms, intensidad 6v, frecuencia 1.0Hz, pulsación continua.
13. Pantalla 5seg/div, 0.1mv/div.
14. El LED de estimulación se coloca a una distancia de 25 de los ojos sobre el soporte universal.
15. Para mejorar la conducción eléctrica, galvanizar los electrodos de registro activo de plata con cloro y una batería de 9v durante 20 segundos. Empleando las puntas caimán conectar un extremo del electrodo al polo negativo de la batería y el otro extremo al polo positivo, sumergir en agua salina normal y observar que gradualmente la plata del electrodo adquiere una coloración blanquecina característica de la capa de cloro.
16. Inducir anestesia quirúrgica por administración intraperitoneal de pentobarbital sódico (6.3gr/100ml) a temperatura ambiente y a dosis de 40mg/kg.
17. Se debe vigilar constantemente el nivel de anestesia, el registro de f-ERG no debe extenderse por más de 20 minutos.

18. Instilar 1 gota de anestésico (tetracaína oftálmica) en cada ojo para evitar el dolor al contacto con los electrodos activos de registro de plata.
19. Instilar 1 gota de midriático (Tropicamida-fenilefrina) en cada ojo para lograr estimulación total de la retina.
20. Retraer ligeramente los párpados y pestañas con un par de ganchos atados a los tornillos de la mesa de cirugía, sin ejercer tracción sobre el ojo y evitando el contacto entre los ganchos y la superficie ocular.
21. Instilar 1 gota de hipromelosa 5% en cada ojo.
22. Colocar el electrodo de referencia en la frente, el electrodo de tierra en la cola y los electrodos activos de registro en bien alineados y en contacto directo con la córnea central.
23. Activar el registro de señales en la ventana del software AcqKnowledge 4.1
24. Encender el estimulador electrónico y permitir 15 pulsos continuos.
25. Para el registro en la base de datos promediar el valor de la onda a-b de los 15 registros electrorretinográficos correspondientes.

Instrumental	Materiales
Sistema de adquisición de datos MP150 Biopac® Systems, Inc. <ul style="list-style-type: none"> - Amplificador diferencial DA100C - Módulo de interfase universal UIM100C - Unidad de adquisición de datos MP150 - Cable ethernet - 2 módulos de electroencefalograma EEG100C 	Pentobarbital sódico 6.3/100ml
Equipo de cómputo	Jeringa 1ml
Software de adquisición y análisis de datos AcqKnowledge 4.1	Clorhidrato de tetracaína solución oftálmica (5mg/ml)
Electroestimulador electrónico SI-10	Hipromelosa oftálmica 0.5%
Cables de salida del estimulador	Hipromelosa oftálmica 2%
Canalizador de pulsos	T-P ofteno solución oftálmica (tropicamida-fenilefrina (8mg/50mg/ml)
2 puntas tipo caimán	Tobramicina oftálmica
LED Galio-Nitriuro ultrabrillante de luz blanca 5mm/800mcd	Hilos para patas
2 electrodos activos de anillo de plata de 7cm de largo x 4mm de diámetro	Porta agujas
Electrodos de alfiler de tierra	Masking-tape
Mesa de cirugía	Cámara de recuperación
2 Blefarostatos	Colchón térmico

Tabla 5. Lista de instrumentos y materiales para f-ERG.

Glaucoma experimental inducido

Dada la semejanza anatómica con las estructuras del segmento anterior humano, la hidrodinámica del humor acuoso y los cambios del nervio óptico asociados al aumento de la presión intraocular se seleccionó y estandarizó un modelo de glaucoma experimental inducido en ratas basado en la inyección intracameral de una mezcla de AH de alto peso molecular e HPMC 0.5%.

Procedimiento

Preparación de AH/HPMC

1. En la balanza electrónica pesar una bandeja con 240mg de hialuronato de sodio en polvo.
2. En la mezcladora térmica preparar 3 ml de HPMC 0.5% a una temperatura de 30°.
3. Agregar el hialuronato de sodio con la HPMC 0.5% y mezclar con agitador magnético a una temperatura constante de 30°C y velocidad de 300rpm durante tres minutos, tiempo aproximado para obtener una mezcla homogénea y sin grumos que puedan obstruir la jeringa.
4. Teñir la mezcla con media tira de fluoresceína BioGlo 1mg.
5. Cargar 25µl de la mezcla en la Jeringa de insulina Ultra Fine™ 3ml con aguja corta 30g x 6mm
6. Expulsar las burbujas de aire acumuladas en la jeringa.
7. Presionar ligeramente el émbolo de la jeringa hasta que se observe una pequeña gota de la mezcla en el bisel de la aguja para prevenir la entrada de aire en la cámara anterior durante la administración.

Administración de AL/HPMC

1. La inyección intracameral es una microcirugía de alta precisión, se recomienda presentarse en condiciones normales de salud, sin sueño, sin fatiga, sin estrés emocional y con disponibilidad de tiempo.
2. Se debe estar sentado en un banco fijo y cómodo.
3. Es posible administrar la mezcla bajo midriasis de la pupila, lo que facilita la administración y reduce el riesgo de lesión del iris, sin embargo, aumenta significativamente la posibilidad de hacer punción en el cristalino, lo que conduce a catarata traumática, infiltración de macrófagos en la retina, activación de las células de Müller, aumento en la expresión de GAP-43 y liberación de factores tróficos como el factor neurotrófico ciliar (CNTF) y el factor inhibidor de leucemia (LIF). Por lo tanto, en este estudio se procedió a la administración de AL/HPMC sin midriatización.
4. En cada aplicación las inyecciones se alternaron una hora en sentido de las manecillas para reducir el trauma corneal, permitir la cicatrización y evitar la fuga de humor acuoso.
5. Se debe realizar una herida autosellante para evitar la necesidad de suturar.
6. Ajustar la distancia interpupilar y el enfoque de los oculares del microscopio quirúrgico.
7. Inducir anestesia quirúrgica por administración intraperitoneal de pentobarbital sódico (6.3gr/100ml) a temperatura ambiente y a dosis de 40mg/kg.
8. Medir y registrar la PIO basal antes del procedimiento.
9. Instilar 1 gota de anestésico (tetracaína oftálmica) en cada ojo para evitar el dolor durante el procedimiento.
10. Colocar la rata anestesiada bajo el microscopio, en decúbito ventral sin mesa de cirugía para lograr mayor comodidad y rango de movimiento.

11. Separar los párpados con blefarostato para exponer el globo ocular.
12. Es posible realizar la inyección aprovechando el lubricado de fábrica de la aguja, sin embargo, esto facilita el derrame de humor acuoso y reduce la posibilidad de realizar una herida autosellante.
13. Secar la superficie ocular con gasas.
14. Es recomendable relajarse y realizar varias respiraciones profundas antes de iniciar el procedimiento. Durante el procedimiento es importante mantener conciencia de la respiración, la postura y el tono muscular. Una respiración agitada, bostezos o cualquier movimiento extraño puede provocar perforación completa del globo ocular, desgarres y hernias del iris, hemorragias internas, fuga de humor acuoso y punción del cristalino.
15. Aproximar la aguja de la jeringa previamente cargada con 25µl de AH/HPMC tangencialmente al limbo esclero-corneal y paralelamente a la superficie del iris con el bisel hacia arriba.
16. Introducir lenta y suavemente la aguja en el estroma corneal, es posible observar una zona traslucida alrededor del bisel al introducir y desplazar la aguja, lo que indica que se encuentra adecuadamente en el espesor del estroma. Al no estar lubricada la aguja habrá mayor fricción con el tejido, se debe desplazar la aguja pausada y lentamente para dar tiempo a que el tejido la cubra antes de inclinarla hacia la cámara anterior.
17. Una vez que el bisel completo de la aguja se interna en el estroma corneal inclinar ligeramente la aguja hacia la cámara anterior e introducirla lenta y suavemente hasta que se observe el bisel completo (+1mm) dentro de la cámara.
18. Al ingresar la aguja en la cámara, hacer cuidadosamente un ligero movimiento torsional de manera que la punta del bisel gire y se separe del endotelio corneal y del iris para reducir el riesgo de lesión.
19. A continuación, presionar suavemente el émbolo de la jeringa a una velocidad aproximada de 20µl/min.

20. La fluoresceína permite observar la entrada y distribución de AH/HPMC.
21. No dejar de presionar el émbolo de la jeringa hasta asegurarse de no haber introducido burbujas de aire a la cámara. En caso de presencia de aire es posible extraer burbujas pequeñas acercando el bisel a la burbuja y dejando de presionar lentamente el émbolo.
22. Una vez administrado el volumen total de AH/HPMC se procede a extraer cuidadosamente la aguja.
23. Realizar nuevamente un ligero movimiento torsional para que el bisel quede nuevamente paralelo a la superficie del iris antes de la extracción.
24. Extraer la aguja lentamente permitiendo que el estroma corneal se vaya deslizando sobre el bisel, sellando la herida.
25. Retirar rápidamente el blefarostato para que los párpados cubran la herida.
26. Dejar la rata 5 minutos bajo el microscopio, sin moverla, para evitar el derrame accidental de humor acuoso y AH/HPMC.
27. Pasar a la rata a la cámara de recuperación, cuidar la posición de la lengua para evitar asfixia. Preferentemente colocar abre-hocicos.
28. Vigilar constantemente la frecuencia respiratoria y cardíaca durante la recuperación.
29. Medir y registrar la PIO a los 30 minutos del procedimiento para asegurarse de haber inducido un cuadro de hipertensión ocular.
30. Aplicar tobramicina ungüento oftálmico.

Instrumental	Materiales
Microscopio estereoscópico con luz integrada	Jeringa de insulina Ultra Fine™ 3ml con aguja corta 30g x 6mm
Mesa de cirugía con orificio para estereotáxico	Jeringa 1ml
Instrumento fijador estereotáxico para cabeza	Pentobarbital sódico 6.3/100ml
Lámpara para restirador	Tetracaína sol. oft. 5mg/ml
Pinza de disección con dientes	Hipromelosa 0.5%
Pinza de disección fina con dientes	Hipromelosa 2%
Porta agujas	Tobramicina ungu. oft. 3mg/gr
Pipeta 1ml	Hialuronato de sodio de alto peso molecular (800kDa)
Puntas para pipeta 1ml	Tiras de fluoresceína BioGlo® 1mg
3 vasos de precipitados de 1ml	4 hilos para patas
1 vaso de precipitados de 10ml	Bandejas para balanza
Balanza electrónica	Espátulas
Caja de Petri	Hisopos
Mezcladora térmica	Gasas
Agitadores magnéticos	Papel
Cámara de recuperación	Guantes de látex
Colchón térmico	Guantes de algodón
Báscula	Blefarostato
Termómetro	
Tonómetro veterinario de rebote Icare Tonovet	
Sondas metálicas	

Tabla 6. Lista de instrumentos y materiales para glaucoma experimental inducido.

Preparación de tejidos

Enucleación del globo ocular y disección de nervio óptico

1. Inducir anestesia quirúrgica por administración intraperitoneal de pentobarbital sódico (6.3gr/100ml) a temperatura ambiente y a dosis de 40mg/kg.
2. Instilar 1 gota de anestésico (tetracaína oftálmica) en cada ojo para evitar el dolor durante el procedimiento.
3. Instilar 1 gota de vasoconstrictor (nafazolina oftálmica) en cada ojo para reducir el sangrado durante el procedimiento.
4. La rata se coloca sobre la mesa de operaciones en decúbito ventral, sujetando la cabeza en el fijador estereotáxico teniendo especial cuidado con la lengua para evitar asfixia durante el procedimiento.
5. Fijar a la rata en la mesa de cirugía atando las cuatro patas con los hilos y sujetándolas a las rondanas localizadas alrededor de la mesa.
6. Ajustar la distancia interpupilar y el enfoque de los oculares del microscopio quirúrgico.
7. Separar los párpados con blefarostato para exponer el globo ocular.
8. Colocar la rata bajo el microscopio quirúrgico.
9. Irrigar la superficie ocular con solución de paraformaldehído 4%.
10. Infiltrar la cámara vítrea tangencialmente con 10µl de paraformaldehído 4% empleando la jeringa para insulina BD Ultrafine™ 3ml y teniendo especial cuidado de no hacer punción del cristalino durante la administración.
11. Irrigar constantemente el globo ocular con hipromelosa 0.5% para evitar desecación.
12. Sujetar la conjuntiva ocular con las pinzas de disección finas con dientes y proceder a cortarla con las tijeras de disección lo más cerca posible del limbo esclero-corneal, respetando y conservando la membrana nictitante, localizada en el canto interno, lo que permitirá

identificar posteriormente los cuadrantes temporal, nasal, superior e inferior de la retina y nervio óptico. Las arterias ciliares anteriores que irrigan la conjuntiva suelen sangrar profusamente, procurar tener suficiente algodón a la mano para contener el sangrado y retirar el exceso de sangre de la cavidad orbitaria pues puede obstruir la visibilidad y dificultar el procedimiento.

13. A continuación, identificar el paquete de músculos extraoculares que incluye en su interior a la arteria oftálmica y la porción orbitaria del nervio óptico.
14. Con las tijeras de disección separar con cuidado los músculos y el nervio óptico.
15. Con las tijeras de disección cortar los músculos extraoculares lo más cerca posible a su inserción en la esclerótica. Las arterias musculares que irrigan a los músculos suelen sangrar profusamente, procurar tener suficiente algodón a la mano para contener el sangrado y retirar el exceso de sangre de la cavidad orbitaria pues puede obstruir la visibilidad y dificultar el procedimiento.
16. Con las pinzas finas con dientes, sujetar el globo ocular por la membrana nictitante, protruir suave y ligeramente, cortar el nervio óptico con las tijeras de disección desde el ápice de la órbita.
17. Para la extracción de proteínas el nervio óptico debe ser extirpado desde el quiasma óptico, continuar con las indicaciones a continuación.
18. Limpiar la piel del cráneo con solución antiséptica.
19. Con el bisturí, hacer una incisión de 2cm en sentido anteroposterior desde la base de la nariz hasta el occipucio.
20. Con las tijeras de disección separar la aponeurosis y el periostio que recubre los huesos parietales y el frontal.
21. Localizar el bregma (articulación fronto-parietal).
22. Con el bisturí, raspar con cuidado los huesos parietales a nivel de las crestas frontales desde el bregma hasta la sutura lambdaidea (articulación parieto-occipital).

23. Introducir con cuidado la legra para hueso por debajo de los huesos parietales, de lado a lado, desprender los huesos parietales haciendo palanca sobre los huesos temporales, dejando expuesto el cerebro de la rata.
24. Con la legra para hueso desprender cuidadosamente el cerebro y levantarlo ligeramente desde los bulbos olfatorios para exponer los nervios ópticos y cortarlos desde el quiasma óptico.
25. Extraer con cautela el globo ocular de manera que los nervios ópticos se deslicen suavemente a través del agujero orbitario.
26. Enjuagar el globo ocular y nervio óptico en abundante solución salina.
27. Depositar el globo ocular en un tubo de ensayo con 3ml de paraformaldehído 4% para cortes histológicos o en un tubo Eppendorf de propileno para extracción de proteínas según corresponda.
28. Almacenar los nervios ópticos en el ultracongelador a una temperatura constante de -80°C .
29. Sacrificar a la rata por sección de la médula espinal.

Instrumental	Materiales
Microscopio estereoscópico con luz integrada	Jeringa 1ml
Mesa de cirugía con orificio para estereotáxico	Pentobarbital sódico 6.3/100ml
Instrumento fijador estereotáxico para cabeza	Jeringa de insulina Ultra Fine™ 3ml con aguja corta 30g x 6mm
Lámpara para restirador	Tetracaína sol. oft. 5mg/ml
Pinza de disección con dientes	Hipromelosa 0.5%
Pinza de disección fina con dientes	Nafazolina sol. oft. 1mg/1ml
Porta agujas	Paraformaldehído 4%
1 vaso de precipitados de 10ml	Solución antiséptica
Báscula	4 hilos para patas
Tijeras de disección	Hisopos
Blefarostato	Gasas
Bisturí	Papel
Tijeras de disección	Guantes de látex
Legra para hueso	Guantes de algodón
	Tubos Eppendorf de propileno
	Tubos de ensayo

Tabla 7. Lista de instrumentos y materiales para enucleación de globo ocular y disección de nervio óptico.

Técnica histológica

1. Después de las 4 semanas de tratamiento con AL se analizaron 7 ojos por cada grupo bajo microscopía óptica.

2. Los ojos fueron enucleados, conservados en paraformaldehído al 4%, refrigerados a una temperatura de -80° y posteriormente fueron incluidos en resina epoxy.
3. Se obtuvieron cortes sagitales de retina (región prelaminar) y cortes transversales de nervio óptico (1mm detrás del polo posterior) de $10\mu\text{m}$ de espesor (Leica RM 2125RT Microtome) que fueron teñidos mediante el protocolo estándar de hematoxilina.

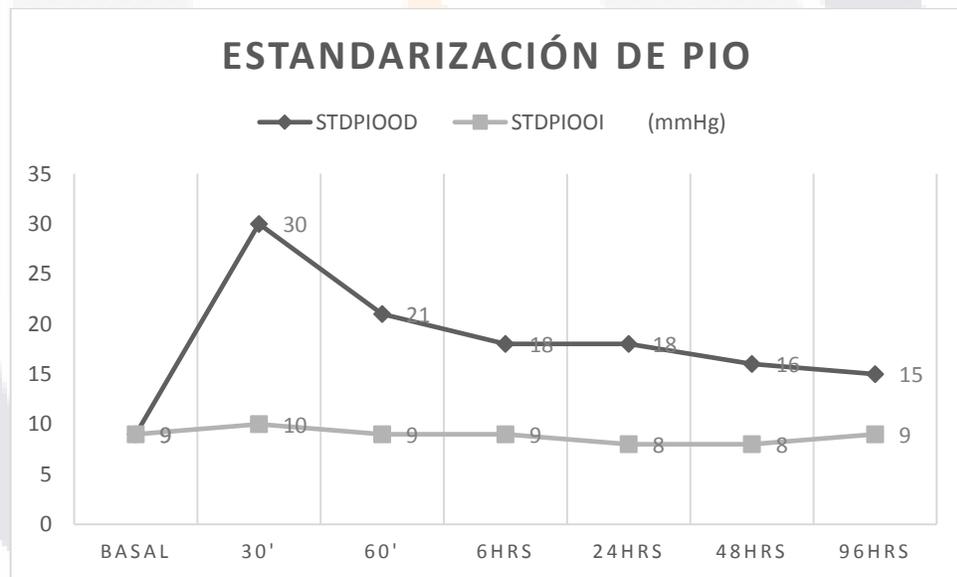
Análisis de imágenes

1. Las preparaciones histológicas fueron visualizadas mediante el microscopio invertido Zeiss AxioScope 40/40 FL, capturadas digitalmente con una cámara AxioVision MR3 (Zeiss) en un formato de salida de 1388×1040 pixeles/150ppp y procesadas con el software Image Pro Plus Software 4.5.1.
2. El conteo de axones del nervio óptico se realizó por secciones completas mediante un proceso automatizado a un aumento de $40\times$ ($4\mu\text{m}$) mediante el software Fiji (Distribución ImageJ).

Resultados

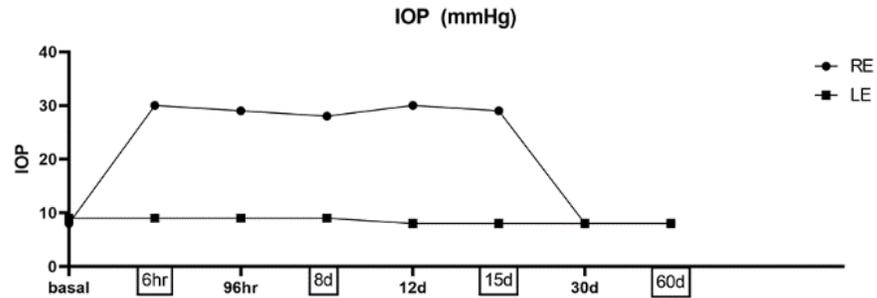
Presión intraocular

La gráfica 1 muestra la curva de estandarización (30min, 60min, 6hrs, 24hrs, 48hrs, 96hrs) de la PIO de 30 ratas (peso $325.93 \pm 10.4\text{gr}$) tratadas con AH/HPMC en ojo derecho (19.66 ± 5.46 mmHg) y solución salina en ojo izquierdo (8.83 ± 0.75 mmHg). El incremento de la PIO en el OD fue significativo ($p=0.0001$) respecto al OI, alcanzando un pico a los 30' y estabilizándose en un valor promedio del doble de la presión basal hacia las 24hrs.



Gráfica 1. Curva de estandarización de la PIO durante la administración de AH/HPMC.

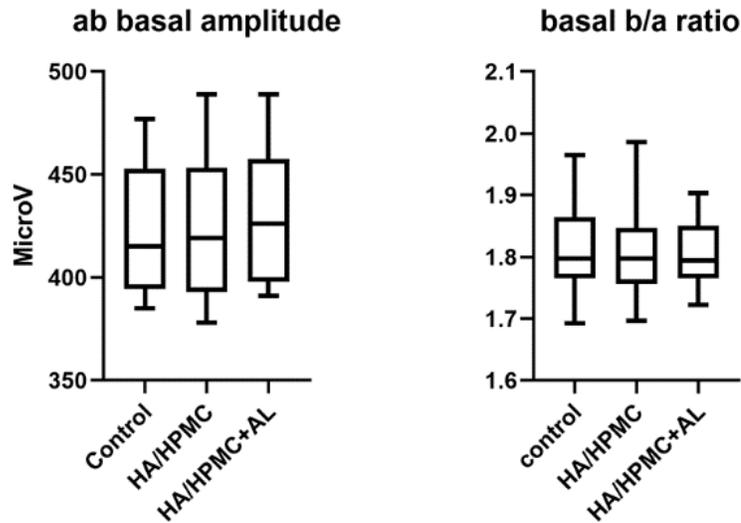
La PIO media (gráfica 2) de los ojos derechos inyectados durante dos semanas con HA/HPMC superó significativamente a la de los ojos izquierdos inyectados con solución salina durante el mismo período ($29,1 \pm 0,54$; $8,6 \pm 0,26$ mmHg; $p < 0,001$). La administración de solución salina en el grupo control no afectó significativamente los valores de PIO.



Gráfica 2. Presión intraocular promedio de los ojos derecho e izquierdo inyectados durante dos semanas con AH/HPMC y solución salina respectivamente.

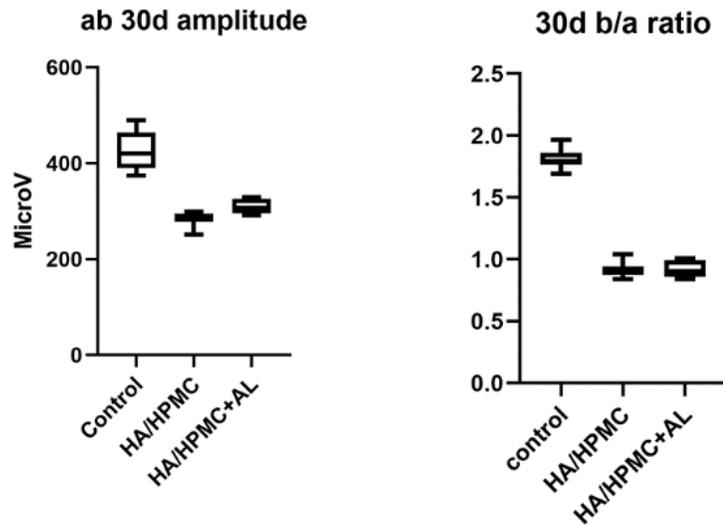
Electrorretinograma

Se realizó un ff-ERG escotópico para identificar el estado funcional de la retina interna. Se determinaron la amplitud promedio de la onda a-b y la relación b/a (amplitud de onda b dividida por la amplitud de onda a). No se encontraron diferencias significativas en la amplitud inicial de la onda a-b y la relación b/a (gráfica 3) de los ojos derechos del grupo control ($421 \pm 31 \mu\text{v}$; $1,813 \pm 0,076$), el grupo HA/HPMC ($429 \pm 30 \mu\text{v}$; $1,808 \pm 0,076$), y el grupo HA/HPMC+LA ($424 \pm 38 \mu\text{v}$; $1,804 \pm 0,052$).



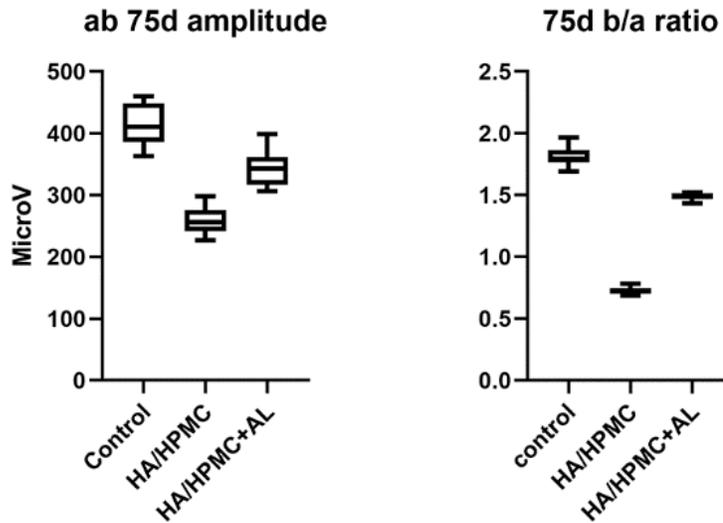
Gráfica 3. La amplitud inicial de la onda a-b de los grupos control, HA/HPMC y HA/HPMC+LA no muestra diferencias significativas. La relación b/a inicial evidencia un equilibrio entre la onda a y la onda b del electroretinograma en todos los grupos.

Durante quince días, los ojos derechos de los grupos 2 y 3 fueron inyectados en la cámara anterior para inducir el glaucoma. Dos semanas más después de las inyecciones, es decir 30 días desde el inicio del estudio, la amplitud de la onda a-b y la relación b/a (gráfica 4) del grupo control permanecieron aparentemente inalteradas ($426 \pm 43 \mu\text{V}$; $1,813 \pm 0,076$), mientras que en el electroretinograma de los otros grupos se observó una reducción de la onda b, disminuyendo tanto la amplitud de la onda a-b como la relación b/a del grupo HA/HPMC ($283 \pm 14 \mu\text{V}$; $0,912 \pm 0,058$) y el grupo HA/HPMC+LA ($299 \pm 7 \mu\text{V}$; $0,914 \pm 0,060$).



Gráfica 4. La amplitud de la onda a-b y la relación b/a disminuyeron en los grupos HA/HPMC y HA/HPMC+AL dos semanas después de la inducción de la hipertensión ocular.

El tratamiento con acetato de leuprolida intramuscular se inició a partir del día 31 y se prolongó por cuatro semanas, se dejaron dos semanas más sin tratamiento y luego se registró el último ff-ERG. La amplitud a-b del grupo control y la relación b/a (gráfica 5) parecían mantenerse estables ($413 \pm 34 \mu\text{V}$; $1,813 \pm 0,076$), mientras que el grupo HA/HPMC aún presentaba una reducción significativa en dichos parámetros ($260 \pm 23 \mu\text{V}$; $0,724 \pm 0,027$). En cambio, el grupo HA/HPMC+LA mostró un aumento significativo en la onda b que determinó un aumento considerable en la amplitud a-b y la relación b/a ($368 \pm 15 \mu\text{V}$; $1,485 \pm 0,026$).



Gráfica 5. La amplitud de la onda a-b y la relación b/a del grupo HA/HPMC+LA aumentó significativamente después del tratamiento con acetato de leuprolida.

Análisis histológico

Sección sagital de la retina

Se analizó el espesor promedio bruto y normalizado de las secciones sagitales de la retina (Imagen 5). En el grupo de control (A) se observó un espesor retiniano total normal y una distribución equilibrada de la retina interna y externa ($173 \pm 2 \mu\text{m}$; $100 \pm 3,11 \mu\text{m}$; $69,1 \pm 0,31 \mu\text{m}$), así como una disposición y trayectoria uniforme de sus capas. En cambio, el grupo HA/HPMC (B) presentó encogimiento en prácticamente todas las capas de la retina, y un adelgazamiento significativo ($p < 0,001$) de la retina interna junto a la ruptura de la capa nuclear interna y la capa nuclear externa en comparación con los del grupo control ($115 \pm 1,45 \mu\text{m}$; $57,7 \pm 1,06 \mu\text{m}$; $60,3 \pm 0,67 \mu\text{m}$). En cambio, el grupo tratado con HA/HPMC+LA (C) muestra un aumento significativo ($p < 0,001$) del espesor retiniano total e interno con respecto al grupo HA/HPMC, aunque no hubo una diferencia significativa en el espesor retiniano externo entre estos grupos. ($144,4 \pm 2,22 \mu\text{m}$; $80,7 \pm 0,95 \mu\text{m}$; $61,8 \pm 1,39 \mu\text{m}$), resulta evidente una estructura más saludable del grupo tratado.

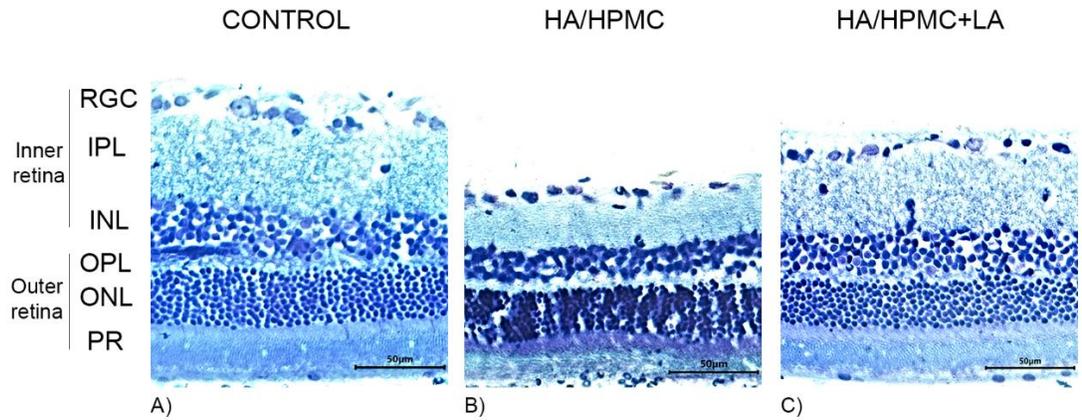


Imagen 5. Microfotografías de corte sagital de la retina (40x). A) El grupo control muestra un grosor y disposición uniforme entre las diferentes capas de la retina, así como una proporción equilibrada entre la retina interna (RGC, IPL, INL) y la externa (OPL, ONL, PR). B) El grupo HA/HPMC presenta retracción en prácticamente todas las capas de la retina, siendo las capas nuclear interna y plexiforme interna las que presentan la afectación más severa. C) El grupo HA/HPMC muestra una diferencia significativa en el espesor y la disposición de las capas. CGR: células ganglionares de la retina; IPL: capa plexiforme interna; INL: capa nuclear interna; OPL: capa plexiforme externa; ONL: Capa nuclear externa; PR: Fotorreceptores)

Sección transversal del nervio óptico

Cortes transversales del nervio óptico

La imagen 6 muestra una descripción general del nervio óptico en los sujetos experimentales. El grupo control presentó una morfología sana, un patrón uniforme de tinción en las regiones central y periférica, sin áreas de perfil glial (A). Se observa una población astrocítica normal y no activada propia de esta porción del nervio óptico emergente, con procesos astrocíticos discretos y delgados y un área astrocítica reducida (1,2%) (B). Los axones nerviosos estaban estrechamente agrupados ($12\ 579 \pm 512$ fibras/mm²) en haces y separados por tabiques delgados (C).

El nervio óptico del grupo HA/HPMC mostró una evidente pérdida de integridad y un patrón de tinción irregular con numerosas áreas de palidez (D). Se evidencia astrogliosis reactiva significativa y procesos astrocíticos hipertróficos, presencia de puntos negros axónicos degenerativos y mayor espaciamiento entre fibras (E). También se observa un menor número de fibras nerviosas (5.686 ± 312 fibras/mm²; $p < 0,001$), edema axonal y una importante zona astrocítica (2,8%) (F).

En cambio, el nervio óptico del grupo HA/HPMC+LA mostró una tinción más regular y áreas menos pálidas (G), menor activación de astrocitos y menor área astrocítica (1,3%) (H), pocas áreas de cicatrización glial y una cantidad de fibras significativamente mayor (9641 ± 290 fibras/mm²; $p < 0,001$) (I).

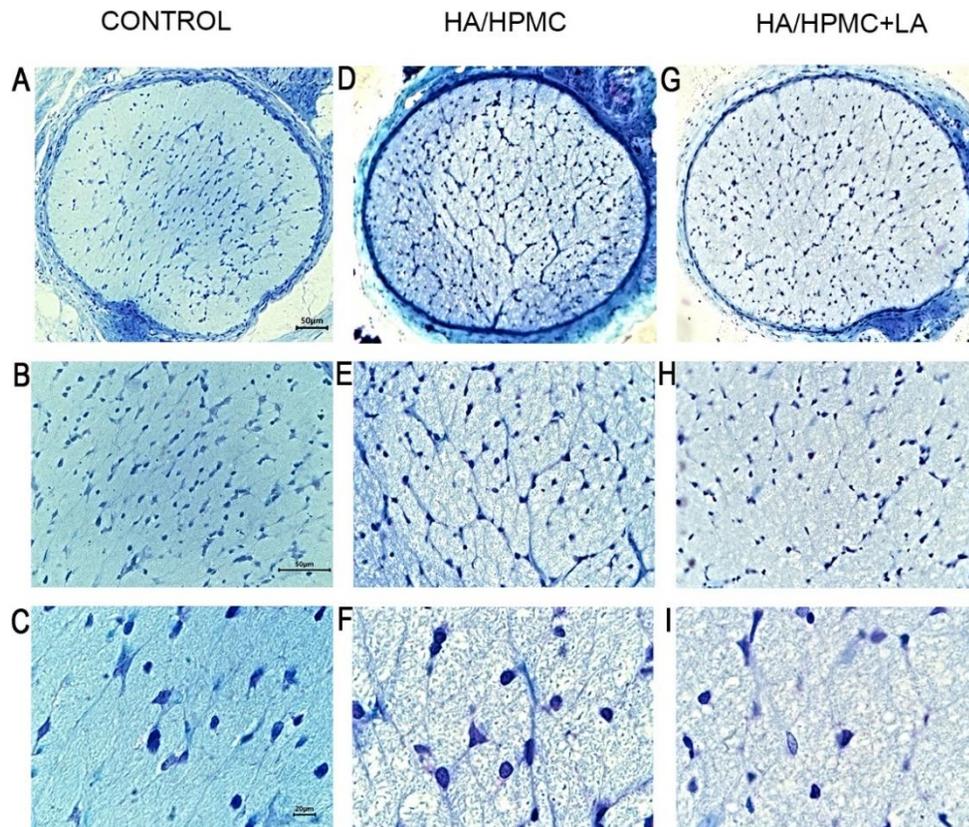


Imagen 6. Micrografías de sección transversal del nervio óptico (10x, 40x, 100x). El grupo control (A, B, C) presenta una morfología sana de elementos neurales y no neurales. El grupo

HA/HPMC (D, E, F) manifiesta varios signos de neurodegeneración, como astrogliosis reactiva y pérdida axonal. El grupo HA/HPMC+LA (G, H, I) muestra una glía menos reactiva y un perfil neuronal más sano.



Discusión

La PIO elevada es un hilo común que conecta la mayoría de las formas de glaucoma y es el principal factor de riesgo de la enfermedad. La última vía común de daño tisular en el glaucoma es el daño axonal que se manifiesta como atrofia del nervio óptico, lo que provoca la pérdida progresiva del campo visual que finalmente conduce a la ceguera.

Se han reportado diferentes modelos experimentales de glaucoma en animales. Estos incluyen los basados en la administración de solución salina hipertónica, cauterización de venas episclerales, fotocoagulación de la malla trabecular, inyección de glóbulos rojos, mutaciones genéticas, aplicación tópica de esteroides, modelos autoinmunes e inyección de látex y microesferas magnéticas.^(38,39) En este estudio se utilizó un modelo basado en la administración de ácido hialurónico en la cámara anterior utilizando como vehículo un agente viscoelástico. En este modelo, la PIO se mantuvo a más del triple del valor de control, al igual que lo obtenido por otros autores.^(40,41) Con este procedimiento se logró inducir una importante afectación tanto de la retina como del nervio óptico.

Habitualmente se ha descrito que el glaucoma es una enfermedad que afecta a las células ganglionares de la retina y a la capa de fibras nerviosas.⁽⁴²⁾ En el grupo HA/HPMC, al igual que en otros estudios, encontramos que puede incluir otros tipos o capas celulares como la capa de células fotorreceptoras, la capa nuclear interna y las capas plexiformes interna y externa de la retina afectada por la enfermedad glaucomatosa.^(4,41)

Se ha propuesto que los axones lesionados de las células ganglionares de la retina pueden presentar cierto grado de regeneración inducida por factores neurotróficos como los producidos por las células de Schwann o el sistema inmunológico en un trasplante de nervio periférico.^(43,44)

Anteriormente informamos que la administración de acetato de leuprolida induce la recuperación de axones mielinizados en el nervio ciático con transección completa y un aumento en el diámetro axonal de ratas lesionadas en la médula espinal.^(13,11) Teniendo en cuenta que el acetato de leuprolida puede tener propiedades neurotróficas, es posible que este fenómeno también esté ocurriendo en la retina y en los axones de las células ganglionares de la retina. El acetato de leuprolida también podría estar induciendo un aumento en el período de supervivencia de las células dañadas, como ocurre con el factor neurotrófico derivado del factor nervioso cerebral después de una lesión del nervio óptico.⁽⁴⁵⁾

Además, se ha dicho que la cicatriz fibrótica impide el crecimiento de axones en las lesiones del nervio óptico, debido a que los astrocitos establecen una barrera física inhibitoria.⁽⁴⁶⁾ Además, la activación de los astrocitos después de la lesión aumenta la expresión de factores proapoptóticos y secretan citoquinas inflamatorias que impactan directamente en la función neuronal.⁽⁴⁷⁾ Nuestros resultados muestran una reducción significativa en el área astrocítica después del tratamiento con acetato de leuprolida, lo que podría mejorar las condiciones del sitio de la lesión como ocurre en la reducción de la cicatriz en ratas lesionadas en la médula espinal cuando se administra acetato de leuprolida.⁽¹²⁾

Los estudios de electroretinograma en diferentes modelos de glaucoma revelan cambios dramáticos en la morfología de varias capas de la retina asociadas con alteraciones funcionales.^(39, 48) En nuestro estudio, el análisis histológico mostró una morfología sana de la retina y el nervio óptico en los ojos derechos del grupo control, mientras que el grupo HA/HPMC presentaba una importante afectación. El ff-ERG reveló que la amplitud de la onda a, dependiente de la retina externa (capa plexiforme externa, fotorreceptores y células de Müller) estaba preservada, mientras que la onda b dependiente de la retina interna (capa plexiforme interna y ON/ OFF células bipolares) fue sensible a la hipertensión ocular, como ocurre en un modelo de glaucoma real,

afectando así a la relación b/a. La amplitud de la onda a-b y la relación b/a del grupo HA/HPMC+LA mostró un aumento significativo con respecto al grupo HA/HPMC y fue similar al del grupo control.

Es interesante notar una correlación entre los cambios de ff-ERG y la expresión del factor trófico en modelos de lesión retiniana. Se ha informado que la supresión y recuperación de la onda a-b se correlaciona temporalmente con una regulación ascendente transitoria del factor neurotrófico ciliar en la retina de ojos con nervios seccionados ^(49, 50, 51), una acción de este factor trófico en el ERG también es sugerido por experimentos en los que la proteína se aplicó directamente en el espacio subretiniano ⁽⁵²⁾, el acetato de leuprolida puede estar actuando de manera similar.

Se ha observado que la aplicación de factores de crecimiento exógenos por sí solo es mínimamente eficaz porque las células ganglionares de la retina dañadas y maduras no están preparadas para responder a la señalización del factor de crecimiento ^(53,54). Sin embargo, la administración de acetato de leuprolida podría estar actuando de manera más eficaz a través de la activación de los receptores de GnRH, que se han informado en el ojo de mamíferos, incluido el humano, específicamente en la retina neural, el nervio óptico y la capa de fibras nerviosas.^(55,56,57)

A pesar de que los resultados obtenidos con respecto al efecto regenerador de una combinación de factor de crecimiento nervioso, neurotrofina 3-5, factor neurotrófico derivado del cerebro y factor neurotrófico ciliar son parciales o no concluyentes ^(58,10), en este trabajo finalmente reportamos que el uso de acetato de leuprolida parece retrasar el proceso de neurodegeneración de la retina y el nervio óptico, siendo un posible método novedoso y amigable que proporciona un tratamiento farmacológico no invasivo para reducir los efectos de la enfermedad glaucomatosa. El acetato de leuprolida administrado vía intramuscular puede atravesar la barrera hematoencefálica como se ha

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

observado en estudios previos ⁽⁵⁹⁾, lo que evita la posible aplicación tópica con riesgos quirúrgicos.

Conclusiones

De acuerdo con nuestros hallazgos actuales, la administración de acetato de leuprolida mejora parcialmente la morfología y la actividad eléctrica de la retina, promueve la recuperación de las fibras nerviosas del nervio óptico y reduce significativamente la astrogliosis en un modelo de glaucoma en rata, por lo que los factores neurotróficos deberían considerarse como un nuevo enfoque terapéutico para el glaucoma primario de ángulo abierto. Este estudio está limitado por factores como una ventana de tiempo corta que no permite evaluar la viabilidad y permanencia celular a lo largo del tiempo, la ausencia de un seguimiento in vivo y la falta de marcadores específicos y estudios de inmunofluorescencia. Se necesita más investigación en esta área, para futuros estudios sugerimos diseños experimentales que permitan observaciones de corto, mediano y largo plazo, inmunohistofluorescencia y estudios de retina completos para un análisis histológico más detallado y seguimiento in vivo por dominio espectral. La tomografía de coherencia óptica. También se sugiere la combinación de acetato de leuprorelina con otros factores neurotróficos y análogos de GnRH, así como diferentes vías de administración.

Referencias bibliográficas

1. Quigley H. The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. *Br. J. Ophthalmol.* 2006; 90, 262-267.
2. Adachi M, Takahashi K, Nishikawa M, Miki H, Uyama M. High intraocular pressure-induced ischemia and reperfusion injury in the optic nerve and retina in rats. *Gra Arch Clin Exp Ophthalmol* 1996; 234: 445-451
3. Zhang S, Wang H, Lu Q, Qing G, Wang N, Wang Y, Li S, Yang D, Yan F. Detection of early neuron degeneration and accompanying glial response in the visual pathway in a rat model of acute intraocular hypertension. *Br. Res* 2009; 131:143
4. Grozdanic S, Sakaguchi D, Kwon Y, Kardon R, Sonea I. Functional characterization of retina and optic nerve after acute ocular ischemia in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44(6):2597–605.
5. Gallego-Ortega A, Norte-Muñoz M, de Imperial-Ollero J, Vidal-Sanz M. Functional and morphological alterations in a glaucoma model of acute ocular hypertension. *Elsv B V.* 2020; 256: 0079-6123
6. Williams P, Benowitz L, Goldberg J, He Z. Axon Regeneration in the Mammalian Optic Nerve. *Annu Rev Vis Sci.* 2020; 6:195–213.
7. Rovere G, Nadal-Nicolas F, Wang J, Bernal-Garro J. Melanopsin-containing or non-melanopsin-containing retinal ganglion cell response to ocular hypertension with or without brain-derived neurotrophic factor neuroprotection. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2016; 57, 6652-6661.
8. Sapieha P, Peltier M, Rendahl K, Manning W, Di Polo A. Fibroblast growth factor-2 gene delivery stimulates axon growth by adult retinal ganglion cells after acute optic nerve injury. *Mol Cell Neurosci.* 2003;24(3):656–72.
9. Logan A, Ahmed Z, Baird A, Gonzalez A, Berry M. Neurotrophic factor synergy is required for neuronal survival and disinhibited axon

- regeneration after CNS injury. *Brain J Neurol*. 2006;129(Pt 2):490–502.
10. Jo S, Wang E, Benowitz L. Ciliary neurotrophic factor is an axogenesis factor for retinal ganglion cells. *Neuroscience*. 1999;89(2):579–91.
 11. Hernández I, Domínguez E, Delgado J, Quintanar J. Recovery of sciatic nerve with complete transection in rats treated with leuprolide acetate: A gonadotropin-releasing hormone agonist. *Neurosci Lett*. 2020; 739:135439.
 12. Díaz C, Gómez B, Salinas E, Calderón D, Hernández I, Bautista E, Quintanar J. Leuprolide acetate induces structural and functional recovery of injured spinal cord in rats. *Neural Regen Res*. 2015;10(11):1819–24.
 13. Guzmán I, Salinas E, Hernández I, Quintanar J. Leuprolide acetate, a GnRH agonist, improves experimental autoimmune encephalomyelitis: a possible therapy for multiple sclerosis. *Neurochem Res*. 2012;37(10):2190–7.
 14. Wilson A, Meethal S, Bowen R, Atwood C. Leuprolide acetate: a drug of diverse clinical applications. *Exp opinion on Invest Drugs*. Taylor & Francis. 2007; 16(11):1851-63.
 15. Altamira M, Medina D, Cruz Y, Calderón D, Kovacs K, Rotondo F, Quintanar J. Leuprolide acetate, a GnRH agonist, improves the neurogenic bowel in ovariectomized rats with spinal cord injury. *Dig Dis Sci*. Springer Science+Business Media. 2019; 65(2):423-430.
 16. Sander r, Fernández M, Echegaray J, Block N, Unoki N, Pérez R, Vidaurre I, Lee R, Nadji M, Schally A. Expression of hypothalamic neurohormones and their receptors in the human eye. *Oncotarget*. 2017; 8(40): 66796–66814
 17. Corona-Jiménez A, Graue-Hernández E. Discapacidad visual y ceguera: impacto en la calidad de vida y costos. *Ciclo videoconferencias interactivas 2015* [Internet]. 2015; Available from:

[http://tie.inspvirtual.mx/recursos/ciclo_videoconferencias/vci15/Discapacidad visual y ceguera-2015.pdf](http://tie.inspvirtual.mx/recursos/ciclo_videoconferencias/vci15/Discapacidad%20visual%20y%20ceguera-2015.pdf)

18. Stephano JLQ. Neurofisiología básica [Internet]. Universidad Autónoma de Aguascalientes; 2000. Available from: <https://books.google.com.mx/books?id=GXczngAACAAJ>
19. Paul L. Kaufman AA. Adler' S Physiology of the Eye. 11th ed. USA: Saunders Elsevier; 2011.
20. Goldberg JL. Optic nerve injury. In: Adler's Physiology of the Eye. 2011. p. 560.
21. Kaushik S, Pandav SS, Ram J. Neuroprotection in glaucoma. J Postgrad Med. 2003;49(1):90–5.
22. Jorge Benozzi, Lucio P. Nahum, Julieta L. Campanelli and RER. Effect of hyaluronic acid on intraocular pressure of rats. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2002
23. Zhang S, Li W, Wang W, Zhang SS, Huang P, Zhang C. Expression and Activation of STAT3 in the Astrocytes of Optic Nerve in a Rat Model of Transient Intraocular Hypertension. PLoS One. 2013;8(1).
24. Laha B, Stafford BK, Huberman AD. Regenerating optic pathways from the eye to the brain. Science (80-). 2017;356(6342):1031–4.
25. Calkins DJ, Pekny M, Cooper ML, Benowitz L, Calkins D, Benowitz L, et al. The challenge of regenerative therapies for the optic nerve in glaucoma. Exp Eye Res [Internet]. 2017;157:28–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.exer.2017.01.007>
26. Benowitz L. YY. Optic Nerve Regeneration. Arch Ophthalmol. 2010;
27. Aguayo a J, Rasminsky M, Bray GM, Carbonetto S, McKerracher L, Villegas-Pérez MP, et al. Degenerative and regenerative responses of injured neurons in the central nervous system of adult mammals. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci [Internet]. 1991;331(1261):337–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1677478>

28. Quintanar JL, Salinas E, González R. Expression of gonadotropin-releasing hormone receptor in cerebral cortical neurons of embryos and adult rats. *Neurosci Lett.* 2007;411(1):22–5.
29. Quintanar JL, Salinas E, González R. Gonadotropin-releasing hormone receptor in spinal cord neurons of embryos and adult rats. *Neurosci Lett.* 2009;461(1):21–4.
30. Quintanar JL, Salinas E. Neurotrophic effects of GnRH on neurite outgrowth and neurofilament protein expression in cultured cerebral cortical neurons of rat embryos. *Neurochem Res.* 2008;33(6):1051–6.
31. Guyton Arthur C HJE. *Textbook of medical physiology.* 12th ed. Sciences-New York. Elsevier Saunders; 2016. 86–89 p.
32. Calderón-Vallejo D, Quintanar-Stephano A, Hernández-Jasso I, Jiménez-Hernández V, Ruiz-Ornelas J, Jiménez I, et al. Functional and Structural Recovery of the Injured Spinal Cord in Rats Treated with Gonadotropin-Releasing Hormone. *Neurochem Res.* 2015;40(3):455–62.
33. Galindo CD, Gómez-González B, Salinas E, Calderón-Vallejo D, Hernández-Jasso I, Bautista E, et al. Leuprolide acetate induces structural and functional recovery of injured spinal cord in rats. *Neural Regen Res.* 2015;10(11):1819–24.
34. Barrera CM, Kastin AJ, Fasold MB, Banks WA. Bidirectional saturable transport of LHRH across the blood-brain barrier. *Am J Physiol - Endocrinol Metab.* 1991;261(3 24-3).
35. Periti P, Mazzei T, Mini E. Clinical pharmacokinetics of depot leuprorelin. *Clin Pharmacokinet.* 2002;41(7):485–504.
36. Guzmán-Soto I, Salinas E, Hernández-Jasso I, Quintanar JL. Leuprolide acetate, a GnRH agonist, improves experimental autoimmune encephalomyelitis: A possible therapy for multiple sclerosis. *Neurochem Res.* 2012;37(10):2190–7.

37. Quintanar JL, Díaz-Galindo C, Calderón-Vallejo D, Hernández-Jasso I, Rojas F, Medina-Aguiñaga D, et al. Neurological improvement in patients with chronic spinal cord injury treated with leuprolide acetate, an agonist of GnRH. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2018;78(4):352–7.
38. Bouhenni R, Dunmire J, Sewell A, Edward D. Animal models of glaucoma. *J Biomed Biotechnol*. 2012;692609.
39. Pang I, Clark A. Inducible rodent models of glaucoma. *Prog Retin Eye Res*. 2020; 75:100799.
40. Benozzi J, Nahum L, Campanelli J, Rosenstein R. Effect of hyaluronic acid on intraocular pressure in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2002;43(7):2196–200.
41. Moreno M, Marcos H, Oscar J, Sande P, Campanelli J, Jaliffa C, Benozzi J, Rosenstein R. A new experimental model of glaucoma in rats through intracameral injections of hyaluronic acid. *Exp Eye Res*. 2005;81(1):71–80.
42. Koppens J. *Essentials in Ophthalmology: Glaucoma*. Clin Experiment Ophthalmol. 2008;36(2):187–8.
43. Berry M, Carlile J, Hunter A. Peripheral nerve explants grafted into the vitreous body of the eye promote the regeneration of retinal ganglion cell axons severed in the optic nerve. *J Neurocytol*. 1996;25(2):147–70.
44. Yin Y, De Lima S, Gilbert H, Hanovice N, Peterson S, Sand R, Sergeeva E, Wong K, Xie L, Benowitz L. Optic nerve regeneration: A long view. *Restor Neurol Neurosci*. 2019;37(6):525–44.
45. Pernet V, Di Polo A. Synergistic action of brain-derived neurotrophic factor and lens injury promotes retinal ganglion cell survival but leads to optic nerve dystrophy in vivo. *Brain J Neurol*. 2006;129(Pt 4):1014–26.
46. Anderson M, Burda J, Ren Y, Ao Y, O’Shea T, Kawaguchi R, Coppola G, Khakh B, Deming T, Sofroniew M. Astrocyte scar

- formation aids central nervous system axon regeneration. *Nature*. 2016;532(7598):195–200.
47. Sofroniew M. Multiple roles for astrocytes as effectors of cytokines and inflammatory mediators. *Neurosci Rev J Bringing Neurobiol Neurol Psychiatry*. 2014;20(2):160–72.
 48. Georgiou A, Guo L, Francesca M, Salt T. Electroretinogram and visual-evoked potential assessment of retinal and central visual function in a rat ocular hypertension model of glaucoma. *Curr Eye Res*. 2014;39(5):472–86.
 49. Chun M, Ju W, Kim K, Lee M, Hofmann H, Kirsch M, Oh S. Upregulation of ciliary neurotrophic factor in reactive Müller cells in the rat retina following optic nerve transection. *Brain Res*. 2000;868(2):358–62.
 50. Cervetto L, Bisti S, Gargini M, Valter K, Stone J. Correlation between trophic factors expression and ERG changes in the nerve sectioned retina. *Undefined*. 2001.
 51. Gargini C, Bisti S, Demontis G, Valter K, Stone J, Cervetto L. Electroretinogram changes associated with retinal upregulation of trophic factors: observations following optic nerve section. *Neuroscience*. 2004;126(3):775–83.
 52. Bok D, Yasumura D, Matthes M, Ruiz A, Duncan J, Chappelow A, Zolotukhin S, Hauswirth W, LaVail M. Effects of adeno-associated virus-vectored ciliary neurotrophic factor on retinal structure and function in mice with a P216L rds/peripherin mutation. *Exp Eye Res*. 2002;74(6):719–35.
 53. Leibinger M, Andreadaki A, Gobrecht P, Levin E, Diekmann H, Fischer D. Boosting Central Nervous System Axon Regeneration by Circumventing Limitations of Natural Cytokine Signaling. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther*. 2016;24(10):1712–25.
 54. Zhang Y, Williams P, Jacobi A, Wang C, Goel A, Hirano A, Brecha N, Kerschensteiner D, He Z. Elevating Growth Factor

Responsiveness and Axon Regeneration by Modulating Presynaptic Inputs. *Neuron*. 2019;103(1):39-51.e5.

55. Wirsig C, Wiechmann A. Vole retina is a target for gonadotropin-releasing hormone. *Brain Res*. 2002;950(1–2):210–7.
56. Schang A, Bleux C, Chenut M, Ngô-Muller V, Quérat B, Jeanny J, Counis R, Cohen J, Laverrière J. Identification, and analysis of two novel sites of rat GnRH receptor gene promoter activity: the pineal gland and retina. *Neuroendocrinology*. 2013;97(2):115–31.
57. Dubovy S, Fernandez M, Echegaray J, Block N, Unoki N, Perez R, Vidaurre I, Lee R, Nadji M, Schally A. Expression of hypothalamic neurohormones and their receptors in the human eye. *Oncotarget*. 2017;8(40):66796–814.
58. 38. Carmignoto G, Maffei L, Candeo P, Canella R, Comelli C. Effect of NGF on the survival of rat retinal ganglion cells following optic nerve section. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 1989;9(4):1263–72.
59. Barrera C, Kastin A, Fasold M, Banks W. Bidirectional saturable transport of LHRH across the blood-brain barrier. *Am J Physiol*. 1991;261(3 Pt 1): E312-318.