

Desarrollo de una metodología para el análisis de opiáceos y cocaína en hueso humano

Lucía Fernández López¹

lucia.fernandez2@um.es

Gemma Prieto Bonete¹

gemmaprietobonete@gmail.com

Javier Navarro Zaragoza¹

jnavarrozaragoza@um.es

Simona Pichini²

simona.pichini@iss.it

Aurelio Luna¹

aurluna@um.es

¹Universidad de Murcia; ²Centro Nacional de Adicción y Dopaje, Roma

Resumen: El propósito de este estudio es desarrollar y validar un método para el análisis de opiáceos y cocaína en hueso humano. Para ello, se recogieron fragmentos costales de 100 cadáveres. Las muestras óseas fueron desecadas, pulverizadas, e incubadas con acetonitrilo en un baño de ultrasonidos. La solución resultante fue sometida a una extracción en fase sólida y analizada mediante GC-MS. El método fue validado en el rango de concentraciones de 0,3-1 ng/mg (dependiendo de la sustancia) a 150 ng/mg, las recuperaciones absolutas medias oscilaron entre 66 %-110 %, el efecto de la matriz entre 62 %-121 % y la eficiencia del proceso entre 61 %-89 %. Los valores de precisión intra e inter-ensayo fueron mejores del 20 %. Para demostrar la fiabilidad del método, fue aplicado a muestras óseas extraídas de 6 cadáveres cuyo análisis toxicológico en sangre para estas sustancias fue positivo. Las sustancias fueron detectadas en hueso en el 80 % de los casos.

Palabras clave: Opiáceos; Cocaína; Hueso; Postmortem; GC-MS.

7.1. Introducción

El análisis toxicológico forense de muestras biológicas, tiene por objeto la detección de sustancias tóxicas, como drogas o medicamentos, en los especímenes obtenidos de cadáveres. Las muestras convencionales que suelen tomarse son sangre, orina u órganos, sin embargo, cuando el cuerpo se encuentra en avanzado estado de descomposición, la mayoría de estas muestras no están disponibles, teniendo que recurrir a matrices alternativas, como son el pelo (Darke, Hall, Kaye, Ross y Duflou, 2002), los dientes (Cattaneo, Gigli, Lodi y Grandi, 2003), las uñas (Engelhart y Jenkins, 2002) o los huesos (Cornthwaite, Labine y Watterson, 2017; Guillot, de Mazancourt, Durigon y Alvarez, 2007).

El hueso es un tejido que se encuentra muy protegido en el cuerpo, reduciéndose la posibilidad de contaminación por sustancias exógenas o de daño físico por exposición. Su empleo en Medicina Forense como matriz para análisis toxicológicos, ha sido investigado ampliamente desde el año 2000, obteniendo resultados alentadores (Watterson, Donohue, 2011; Wiebe y Watterson, 2014; Watterson y Botman, 2009; Watterson, Desrosiers, Betit y cols. 2010).

A pesar de este impulso en los últimos años, no existen protocolos estandarizados para la extracción y cuantificación de sustancias en esta matriz en humanos, pues aunque se han descrito estudios empleando tejidos humanos post-mortem, principalmente se han desarrollado investigaciones con animales de experimentación bajo condiciones controladas. Por ello, consideramos de gran interés el desarrollo y validación de una metodología para la detección y cuantificación de sustancias en tejido óseo humano.

Los opiáceos y la cocaína son drogas de un elevado consumo, que producen numerosas intoxicaciones, generando importantes riesgos para la

salud de los consumidores, y llegando a producir la muerte. Constituyen un grupo de gran interés médico-legal ya que se trata de las sustancias tóxicas que más frecuentemente se detectan en los casos de sobredosis mortal, situaciones que suelen contemplar la realización de autopsias (Observatorio Europeo de las Drogas y las Toxicomanías, 2018). Por este motivo, hemos decidido centrarnos en ellas para la realización de nuestro estudio.

Por tanto, el propósito de este estudio es desarrollar y validar un método para la extracción, detección y cuantificación simultáneas de opiáceos y cocaína en tejido óseo humano. Para demostrar la fiabilidad del método, será aplicado a muestras óseas extraídas de cadáveres cuyo análisis toxicológico en sangre para estas sustancias fue positivo.

7.2. Materiales

Los estándares empleados para el desarrollo del estudio fueron los siguientes: 6-Monoacetilmorfina (6-MAM), morfina, cocaína, benzoilecgonina (BEG), metadona y tramadol. El patrón interno (IS) empleado fue Nalorfina.

Se recogieron 100 muestras de fragmentos costales de cadáveres autopsiados en el Instituto de Medicina Legal de Murcia. A todos los cadáveres se les extrajo también una muestra de sangre que se sometió a un análisis toxicológico. Las muestras óseas procedentes de cadáveres con resultados toxicológicos negativos en sangre, se postularon como posibles muestras libres de tóxicos (blancos) que, tras su verificación, se emplearon para los procesos de desarrollo y validación del método. Las muestras óseas con resultados positivos en sangre, se emplearon para la aplicación del método desarrollado en muestras reales. El estudio fue evaluado y aprobado por el Comité de Ética de la Universidad de Murcia.

La cromatografía de gases-espectrometría de masas se llevó a cabo mediante un cromatógrafo de gases Serie Plus 6890 equipado con un auto-muestreador Agilent 7683 y acoplado a un detector selectivo de masas 5973N (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA).

7.3. Métodos

7.3.1. Preparación de las muestras

Todos los fragmentos costales fueron desprendidos de los restos de tejidos blandos adheridos, se trocearon en fracciones de aproximadamente 0,5-1 cm y se secaron en estufa a 50°C durante 24 horas. Tras este periodo se pulverizaron empleando un molino de bolas a una velocidad de 30 ciclos/segundo durante 2 minutos (Millmix 20, Biogen, Madrid, España). El polvo de hueso resultante se conservó en tubos de plástico a -80° C hasta su análisis.

7.3.2. Preparación de los estándares de calibración, controles de calidad y patrón interno

Se prepararon diariamente estándares de calibración de cada sustancia a 5 concentraciones distintas: 10, 25, 50, 75 y 150 ng/mg de hueso y 3 controles de calidad (QC) a 100 ng/mg (alta concentración), 45 ng/mg (media concentración) y 20 ng/mg (baja concentración) añadiendo la cantidad necesaria de las soluciones stock (100 µg/ml) a 300 mg de hueso blanco. El IS Nalorfina se añadió a todas las muestras a una concentración de 50 ng/mg de hueso.

7.3.3. Procesos de extracción y análisis

Protocolo de extracción

A 300mg de polvo de hueso se le añadió el IS y acetonitrilo, y se sometió a sonicación durante 1 hora. A continuación, se añadió tampón fosfato a pH 6 0.1 M y se centrifugó durante 5 min a 3500 rpm. El sobrenadante se sometió a una extracción en fase solida con columnas de extracción CleanScreen PKG50 (3cc, 200 mg, United Chemical Technologies, Bristol, PA), las cuales fueron precondicionadas con metanol y tampón fosfato pH 6, tras lo cual se añadió la muestra y fueron lavadas con agua y ácido clorhídrico. Tras esto se secaron y se volvieron a lavar con metanol. La elución se realizó con Diclorometano:Isopropanol:Amoniaco (78:20:2). El eluido se llevó a sequedad en corriente de nitrógeno y una vez seco, se añadió BFTSA 1 %TMS y se mantuvo a 70° C durante 30 min. Tras esto, se dejó enfriar y se inyectó 1 μ l in GC-MS.

La separación de los analitos se realizó mediante una columna capilar (ZB-SemiVolatiles, 30 m de longitud \times 0.25 mm de diámetro interno y 0.25 μ m de espesor de película, Phenomenex). La temperatura del horno se programó a 120° C durante 1 minuto (min), incrementó hasta 240° C a razón de 30° C/min y se mantuvo 3 min. A continuación, alcanzó los 290° C a razón de 10° C/min y se mantuvo durante 10 min. Se empleó el modo Splitless. El Helio (99 % de pureza) se empleó como gas de arrastre a una velocidad de flujo de 1 ml/min. Las temperaturas del puerto de inyección, la fuente de ionización, el cuadrupolo y la interfaz fueron 260, 230, 150 y 280 °C respectivamente.

El espectro de masas de impacto de electrones (EI) de los analitos se obtuvo en el modo “total ion monitoring” (en el rango de 40-550 m/z) para determinar el tiempo de retención (RT) y las masas de los fragmentos característicos de cada sustancia. En el modo “selected ion

Tabla 7.1: Tiempos de retención e iones característicos de las sustancias analizadas mediante GC-MS. Los iones subrayados son los empleados para la cuantificación.

Sustancia	RT	Iones característicos
Cocaína	8,52	82-182- <u>272</u> -303
Benzoilecgonina	9,05	82-240- <u>361</u>
Morfina	11,14	287-401-414- <u>429</u>
6-MAM	11,73	287-340- <u>399</u>
Tramadol	6,53	58- <u>263</u> -153
Metadona	7,87	72-223- <u>294</u>
Nalorfina	12,19	414-440- <u>455</u>

monitoring” (SIM) se monitorizaron dichos iones característicos y para la cuantificación se emplearon los que aparecen subrayados en la Tabla 7.1.

7.3.4. Procedimientos de validación

Antes de la aplicación a muestras reales, el método fue sometido a un protocolo de validación siguiendo los criterios aceptados para la validación bioanalítica de métodos (Wille, Coucke, De Baere y Peters, 2017; Peters, Wissenbach, Busardò, Marchei y Pichini, 2017). Como en trabajos previos (Marchei et al., 2011; Pichini et al., 2016), se evaluaron la selectividad, los remanentes, la recuperación, el efecto de matriz, la eficiencia, la linealidad, la precisión, la exactitud, los límites de detección y cuantificación y la estabilidad. Para el cálculo de la recuperación, el efecto matriz, la eficiencia, la precisión y la exactitud se emplearon los QC de cada analito preparados por quintuplicado cada día y en 5 días diferentes.

7.3.5. Análisis estadístico

Se realizó un análisis de correlación de Pearson para analizar la correlación entre las concentraciones de sustancias en sangre y hueso. Se consideraron estadísticamente significativos aquellos valores de $p < 0,05$.

7.4. Resultados

7.4.1. Validación

Las curvas de calibración lineal realizadas por triplicado para todos los analitos investigados mostraron coeficientes de determinación (r^2) $\geq 0,990$. Los LOD y LOQ aparecen en la Tabla 7.2. Los valores de precisión intra e inter-ensayo obtenidos por triplicado para 3 concentraciones diferentes fueron $\leq 20\%$. El efecto matriz promedio fue de 62%-121%, la recuperación de 66%-110% y la eficiencia del proceso de 61%-89%. No se observó degradación significativa después de cualquiera de los tres ciclos de congelación/descongelación. No se encontraron interferencias con sustancias endógenas a los tiempo de retención de los analitos de interés, ni tampoco entre los compuestos objeto de investigación.

7.4.2. Aplicación a muestras reales

El método desarrollado se aplicó a muestras óseas de 6 cadáveres cuyo análisis toxicológico en sangre fue positivo para las sustancias en estudio. La Tabla 7.3 muestra las concentraciones de las sustancias en sangre y hueso. Mediante el análisis de correlaciones bivariadas de Pearson obtuvimos un coeficiente de correlación entre las concentraciones de las

Tabla 7.2: Límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) de cada sustancia.

Compuesto	LOD(ng/mg)	LOQ(ng/mg)
6-MAM	0,1	0,3
Morfina	0,3	1,0
Cocaína	0,2	0,5
BEG	0,2	0,8
Tramadol	0,2	0,5
Metadona	0,3	0,8

sustancias en sangre y hueso del 0,921 ($p < 0,05$).

7.5. Discusión

El tejido óseo es una matriz sólida, resistente y heterogénea, cuyo tratamiento y análisis es más complejo que en el caso de las matrices empleadas habitualmente, como la sangre o la orina, de manera que los estudios existentes sobre la detección de las sustancias bajo estudio en hueso no son muy abundantes y menos aún si hablamos de hueso humano. Respecto a esto, Raikos, Tsoukali y Njau (2009) también encontraron morfina en tejido óseo en un caso de una muerte por sobredosis de un adicto a la heroína. McGrath y Jenkins (2009) detectaron morfina en restos óseos humanos en solo 1 de los 13 casos cuyo análisis sanguíneo resultó positivo, contrastando con nuestro estudio en el que la morfina se detectó en hueso en todos los casos positivos en sangre. Ninguno de estos dos estudios encontró 6-MAM en hueso humano, sugiriendo que los motivos podían ser que el método no era el adecuado para su extracción (Raikos et al., 2009), y la inestabilidad de esta sustancia (McGrath y Jenkins, 2009). En nuestro caso, de acuerdo con un estudio realizado en ratones donde se detectaron 6-MAM y morfina en hueso (Guillot et al., 2007),

Tabla 7.3: Concentración en sangre y aproximaciones de los niveles en hueso de las sustancias en investigación en las muestras procedentes de 6 casos reales. ND no detectado.

Muestra	Sustancia	Concentración en sangre (ng/ml)	Concentración en hueso (ng/g)
1	Metadona	950	15
	BEG	860	11
2	Metadona	820	16
	6-MAM	480	5
	Morfina	130	3
	BEG	40	N.D.
3	Metadona	920	14
	Morfina	230	4
	6-MAM	310	3
4	Metadona	1220	28
	Tramadol	210	6
5	Metadona	450	N.D.
	6-MAM	160	N.D.
6	Metadona	1060	21
	Morfina	360	7

la 6-MAM se encontró en 2 muestras óseas de los 3 casos positivos en sangre a esta sustancia, demostrando que el método es apropiado para su análisis y que, al ser la 6-MAM el principal metabolito de la heroína, podría permitir detectar dicho consumo.

Acercas de los opiáceos sintéticos de nuestra investigación, la metadona fue positiva en las muestras de sangre de los 6 cadáveres y se detectó en el hueso en el 83 % de los casos (en 5 de 6 casos), y el tramadol se cuantificó en el hueso en el único caso en que se encontró en sangre, coincidiendo con otros estudios realizados en animales en los que se detectó tramadol en hueso de rata (Cornthwaite et al., 2017; Wiebe. y Watterson, 2014). Un método para la detección de drogas en hueso que incluya estas dos sustancias es de gran interés forense ya que, aunque la heroína es la droga más frecuentemente encontrada en los informes toxicológicos de sobredosis fatales, estos otros opiáceos, principalmente la metadona, pero también el tramadol, están asociados con una parte sustancial de las sobredosis. Además, la metadona es el fármaco de sustitución de opiáceos prescrito con mayor frecuencia, recibido por casi dos tercios (63 %) de los pacientes en tratamiento de sustitución en Europa (Observatorio Europeo de las Drogas y las Toxicomanías, 2018).

Sobre la BE, principal metabolito de la cocaína, encontramos un estudio en el que fue detectada en 5 muestras óseas humanas de los 7 casos positivos en sangre (McGrath y Jenkins, 2009) y en nuestro estudio fue detectada en 1 de los 2 casos positivos en sangre. En el caso en el que no se detectó BE en hueso, la concentración sanguínea fue muy baja (40 ng/ml) y en todos nuestros casos, las concentraciones de sustancias en hueso fueron mucho más bajas que sus correspondientes en sangre, de manera que este resultado negativo en hueso podría significar que la BE se encontraba en hueso en concentraciones muy bajas, estando quizás por debajo del límite de detección del método. Su droga madre, la cocaína, no se encontró en ningún caso, ni en los 2 casos en los que se detectó su principal metabolito, indicando su metabolismo a BE.

Un aspecto a resaltar en nuestra investigación son los datos del estudio de correlación que sugieren que las concentraciones de sustancias observadas en sangre y hueso pueden compararse. El valor absoluto del coeficiente de correlación fue de 0,921, lo que indica una fuerte correlación. Estos resultados no están en concordancia con otros estudios realizados en animales donde se encontraron bajas correlaciones de 6-MAM, morfina y tramadol entre ambas matrices (Guillot y cols., 2007; Wiebe y Watterson, 2014). En el único estudio encontrado en el que se realizara este análisis de correlación empleando hueso humano, parece no existir relación entre las concentraciones en hueso y sangre de 6-MAM, morfina, cocaína, BE y tramadol, entre otros (McGrath y Jenkins, 2009).

En cualquier caso, se trata de datos preliminares obtenidos en el primer estudio de estas características desarrollado en humanos, con un número muy bajo de pacientes y con el objetivo principal de validar un método simple y rápido para determinar opiáceos y cocaína en hueso. Es necesario continuar investigando en esta área, pues como hemos explicado en esta sección, muchos son los factores que podrían influir en la concentración postmortem del compuesto en el hueso y por consiguiente en esta correlación. Por ello, la elaboración de una base de datos amplia y exhaustiva de los niveles de sustancias en diversos tipos de hueso, recogidos de numerosos casos y utilizando metodologías de preparación de muestras estandarizadas sería de gran valor (Watterson y Donohue, 2011).

7.6. Referencias

Cattaneo, C., Gigli, F., Lodi, F. y Grandi, M. (2003). The detection of morphine and codeine in human teeth: an aid in the identification and study of human skeletal remains. *Journal of Forensic Odontostomatol.* 21(1), pp. 1-5.

- Cornthwaite, H.M., Labine, L. y Watterson, J.H. (2017). Semi-quantitative analysis of tramadol, dextromethorphan, and metabolites in decomposed skeletal tissues by ultra performance liquid chromatography quadrupole time of flight mass spectrometry. *Drug Testing and Analysis*. 1–7.
- Darke, S., Hall, W., Kaye, S., Ross, J. y Duflou, J. (2002). Hair morphine concentrations of fatal heroin overdose cases and living heroin users. *Addiction*. 97(8), pp. 977-84.
- Engelhart, D.A., Jenkins, A.J. (2002) Detection of cocaine analytes and opiates in nails from postmortem cases. *Journal of Analytical Toxicology*. 26(7), pp. 489-92.
- Guillot, E., de Mazancourt, P., Durigon, M. y Alvarez, J.C. (2007). Morphine and 6-acetylmorphine concentrations in blood, brain, spinal cord, bone marrow and bone after lethal acute or chronic diacetylmorphine administration to mice. *Forensic Science International*, 166, pp. 139–144.
- Marchei, E., Escuder, D., Pallas, C.R., Garcia-Algar, O., Gomez, A., Friguls, B., y cols. (2011). Simultaneous analysis of frequently used licit and illicit psychoactive drugs in breast milk by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 55, pp. 309-16.
- McGrath, K.K. y Jenkins, A.J. (2009). Detection of drugs of forensic importance in post-mortem bone. *American Journal of Forensic Med Pathology*. 30, pp. 40-44.
- Observatorio Europeo de las Drogas y las Toxicomanías (2018), Informe Europeo sobre Drogas 2018: Tendencias y novedades, Oficina de Publicaciones de la Unión Europea, Luxemburgo. Disponible en: <http://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/8585/>

20181816_TDAT18001ESN_PDF.pdf (Acceso en octubre de 2018).

Peters FT, Wissenbach DK, Busardò FP, Marchei E, Pichini S. (2017) Method Development in Forensic Toxicology. *Current Pharmaceutical Design*, 23, pp. 5455-67.

Pichini, S., Cortes, L., Marchei, E., Solimini, R., Pacifici, R., Gomez-Roig, M.D. y García-Algar, O. (2016). Ultra-high-pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry determination of antidepressant and anxiolytic drugs in neonatal meconium and maternal hair. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 118, pp. 9-16.

Raikos, N., Tsoukali, H., Njau, S.N. (2009). Determination of opiates in postmortem bone and bone marrow. *Forensic Science International*. 123, pp. 140–141.

Watterson, J.H. y Botman, J.E. (2009). Detection of acute diazepam exposure in bone and marrow: Influence of tissue type and the dose-death interval on sensitivity of detection by ELISA with liquid chromatography tandem mass spectrometry confirmation. *Journal of Forensic Science*. 54, pp. 708-14.

Watterson, J.H., Desrosiers, N.A., Betit, C.C., Dean, D. y Wyman, JF. (2010) Relative distribution of drugs in decomposed skeletal tissues. *Journal of Analytical Toxicology*. 34, pp. 510-515.

Watterson, J.H., Donohue, J.P. (2011) Relative distribution of ketamine and norketamine in skeletal tissues following various periods of decomposition. *Journal of Analytical Toxicology*, 35, pp. 52–458.

Wiebe, T.R. y Watterson, J.H. (2014). Analysis of tramadol and O-desmethyltramadol in decomposed skeletal tissues following acute and repeated tramadol exposure by gas chromatography mass

spectrometry. *Forensic Science International*. 242, pp. 261-5.

Wille SMR, Coucke W, De Baere T, Peters FT. (2017) Update of Standard Practices for New Method Validation in Forensic Toxicology. *Current Pharmaceutical Design*, 23, pp. 5442-54.

Capítulo 8

Estudio funcional y morfométrico de la retina de la rata albina adulta tras una hipertensión ocular aguda

Estudio funcional y morfométrico de la retina de la rata albina adulta tras una hipertensión ocular aguda

Alejandro Gallego Ortega

Dpt. Oftalmología de la Universidad de Murcia y Instituto Murciano de Investigación Biosanitaria Virgen de la Arrixaca (IMIB-Arrixaca)

alejandrogallego@um.es

Resumen: Objetivo: Analizar la retina de la rata funcional y morfométricamente, tras inducir una hipertensión ocular aguda (HTOA). Materiales y Métodos: Se canuló la cámara anterior del ojo con un sistema hidrostático de presión para subir la PIO hasta 75 mmHg durante 90 minutos. Posteriormente se realizó electroretinograma y OCT y finalmente se obtuvieron secciones radiales de la retina que inmunoteñimos con recoverina y proteína kinasa c para bipolares de cono (CBC) y bastón (CBB) y medir el espesor de la retina. Resultados: A las 24h de la lesión, hubo una disminución de todas las ondas electroretinográficas, tanto en condiciones escotópicas como fotópicas. La OCT y las secciones mostraron una pérdida progresiva de la retina interna y externa. La población de CBB se mantuvo estable, y las CBC disminuyó aproximadamente al 50%. Conclusiones: La HTOA produce daños funcionales y morfológicos permanentes en la retina interna, y también en la retina externa.

Palabras clave: Retina; electroretinograma de campo completo; OCT; hipertensión ocular aguda; recoverina; pkc- α .

8.1. Introducción

La importancia del glaucoma en nuestra sociedad es cada vez más relevante y a día de hoy no tiene cura. Por ello se han desarrollado numerosos modelos experimentales que simulan esta enfermedad, y de este modo evaluar los cambios fisiológicos que se producen e investigar, por ejemplo, el efecto de posibles fármacos que palien o curen la enfermedad.

8.1.1. El glaucoma

El glaucoma es la primera causa de ceguera irreversible en el mundo, con aproximadamente 7.6 millones de personas ciegas bilateralmente en el mundo, según la definición de ceguera establecida por la Organización Mundial de la Salud (OMS). Se estima que, en los países industrializados, aproximadamente la mitad de los pacientes con glaucoma no saben que lo padecen. En los países en desarrollo el número de individuos afectados y que no sabe que padece la enfermedad, es aún mayor. Mediante exámenes oculares periódicos, la detección temprana y el tratamiento adecuado, se puede prevenir la pérdida visual. Médicamente el término glaucoma hace referencia a un grupo de enfermedades oculares fisiopatológicamente heterogéneas, las cuales comparten un tipo de neuropatía óptica característica, asociada a la pérdida progresiva de la función visual. El glaucoma se caracteriza por la pérdida de células ganglionares y axones de la retina, que se hace evidente a nivel de la capa de fibras nerviosas de la retina y en el disco óptico, hasta que provoca defectos característicos de los campos visuales. A medida que las CGR mueren por efecto del aumento de la presión intraocular, sus axones desaparecen, el disco óptico comienza a aumentar su excavación y adopta una forma de “copa” (Cioffi, G., 2011). Uno de los factores de riesgo más importantes de esta enfermedad es el aumento de la presión intraocular. Esta presión

es producida por la incapacidad del ojo de drenar el humor acuoso localizado en la cámara anterior. Se ha demostrado que el riesgo de glaucoma aumenta un 12 % con cada mm Hg de PIO que se eleve (Dietlein TS, Hermann MM y Jordan JF, 2009). Para nuestro experimento hemos elegido la rata albina como animal experimental y hemos simulado un ataque de glaucoma aguda, elevando la PIO. Existen numerosas técnicas para un diagnóstico precoz de esta enfermedad, dos de ellas son utilizadas en este estudio como la tomografía de coherencia óptica y el electroretinograma de campo completo. La tomografía de coherencia óptica o OCT, es una técnica de diagnóstico no invasiva que proporciona imágenes en sección transversal con alta resolución de los tejidos. La OCT muestra la imagen artificialmente como un código de colores, traducido por un software que funciona con el principio de reflectividad: a mayor reflectividad, mayor color (amarillo-verde), y a menor reflectividad, menor color (negro-azul) (Vizzeri, G., Kjaergaard, S. M., Rao, H. L. y Zangwill, 2L. M, 2009); así como del resto de las capas de la retina (Cuenca N, Ortuño-Lizarán I y Pinilla I., 2018) El electroretinograma de campo completo registra la actividad eléctrica generada por las células neurales y no neurales de la retina que es el resultado de los cambios en la circulación trans-retiniana de los iones (principalmente, Na^+ y K^+) tanto en el medio intracelular como el extracelular que se produce como respuesta de la estimulación de la retina a la estimulación nerviosa (Fishman GA., 2001). El conjunto de corrientes que se generan en una dirección de una población de células, se llaman potenciales de campo, que son registrados cuando son lo suficientemente grandes. En el ERG de campo completo, podemos registrar diferentes ondas: i) La onda a, es la primera onda que aparece, es negativa y está generada por los bastones en condiciones escotópicas y por los conos en condiciones fotópicas. Esta onda registra la hiperpolarización de los fotorreceptores; ii) La onda b, es la primera onda positiva, la más sensible y la de mayor amplitud, de ahí que sea la más fácil de registrar. Proviene de la despolarización de las células bipolares ON, en respuesta a un estímulo luminoso; iii) La onda c es la más tardía, se le atribuye a las células de Müller y al epitelio pigmentario de la retina; iv)

La respuesta umbral escotópica o STR (Scotopic Threshold Response), aparece con estímulos muy tenues, es una onda con amplitud corta, que se ha observado en humanos, gatos, monos, ratas y ratones (Frishman LJ y Steinberg RH, 1989a; 1989b; Bui BV y Fortune BJ, 2004; Alarcón-Martínez L et al., 2009; 2010). El origen de esta respuesta se ha atribuido a la retina interna, en concreto a las CGR y amacrinas.

8.1.2. Sistema visual

Como nuestro modelo experimental se basa en el ojo de este animal, y en concreto nos centramos en la retina es necesario explicar brevemente el sistema visual de este roedor y cuál es su organización, ya que su conocimiento va a ser vital para entender bien los cambios degenerativos que se pueden producir.

Sucintamente, tanto en humanos como en roedores, la luz pasa a través de la córnea, y atraviesa los medios oculares transparentes hasta llegar a la retina. La retina del roedor, como la de todos los vertebrados, tiene seis tipos de neuronas que se alojan en capas diferenciadas; en la capa más externa, situada en contacto con la coroides, están los fotorreceptores que se encargan de la fototransducción, es decir la captación de energía electromagnética y su transformación en energía eléctrica que es el lenguaje que utilizan las células nerviosas para comunicarse entre sí (Kolb H., 1977). Los seres humanos tienen varios tipos de fotorreceptores: un tipo detecta la luz tenue y tiene por tanto gran sensibilidad a la luz (bastones) y otros tipos son menos sensibles a la luz, pero detectan los colores (conos). Tenemos tres tipos de conos: rojo, verde y azul ó L, M y S, respectivamente según la longitud de onda a la que son más sensibles (L, large; M, medium; S, short). El resultado de la fototransducción, sale de los fotorreceptores y llega la capa de interconexión neuronal en la plexiforme externa; en esta capa se produce una modulación de esta

información por el concurso de las células horizontales, y de esta capa la información alcanza la capa media de la retina. En la plexiforme externa es dónde los pedículos de los conos y las esférulas de los bastones hacen sinapsis con los distintos tipos de células bipolares y con las células horizontales. Más hacia dentro, encontramos la capa nuclear interna (NI). Técnicas clásicas de tinción argéntica y de Golgi, dieron lugar a la descripción de hasta 5 estratos diferentes en esta capa (Mariani AP., 1984; Kolb H, Goede P, Roberts S, McDermott R y Gouras P., 1997), según la arborización de los terminales de las bipolares, de los procesos de las células amacrinas y ganglionares. En esta capa se pueden contabilizar cuatro poblaciones de células nerviosas. Por un lado, las células horizontales que se comunican de manera tangencial entre sí y entre otras células y por otro, encontramos las células bipolares, células 3interplexiformes y amacrinas. En retina humana encontramos 11 tipos de células bipolares con tinción de Golgi. Diez de ellas son para cono y tan solo una es para bastón 15 . Anatómicamente, en la retina central, los árboles dendríticos bipolares son pequeños ($15 \mu\text{m}$ de ancho) y se ponen en contacto con 15-20 bastones. En la retina periférica, el árbol dendrítico tiene $30 \mu\text{m}$ de ancho y contacta con 40-50 bastones (Hubel, 2000).

Con respecto a los diez tipos de CBC. Siete de ellas reciben información simultánea de numerosos conos, a estas bipolares se les conoce como bipolares de cono difusas. Y las otras tres CBC contactan con los conos con una relación de 1:1, e informan a las CG enanas, estas son conocidos como bipolares enanas. Estas bipolares pueden hacer contactos basales o invasivos en los pedículos y esférulas de los fotorreceptores.

Posteriormente encontramos la plexiforme interna, es una capa muy compleja donde realizan la sinapsis: bipolares, amacrinas, ganglionares e interplexiformes. Atendiendo a los dos tipos de contacto entre célula bipolar y fotorreceptor indicado anteriormente; se piensa que las células bipolares actúan de la misma forma a la luz que los fotorreceptores cuando contactan con ellos de manera basal, con una hiperpolarización lenta

(canal OFF); y, por otro lado, actúan de forma antagonista al fotorreceptor cuando los terminales invaginan dentro de los pedículos o esférulas, dando una respuesta de despolarización lenta (canal ON).

No todos los axones de las CB terminan en el mismo lugar; sino que lo hacen de una manera diferenciada en la PI. Esto determinará el tipo de señal transmitida a la célula ganglionar, ya sea de centro ON u OFF, es esencialmente determinado por las células bipolares. Esto hace que la PI esté formada funcionalmente por dos subláminas: la sublamina a, formada por los dos estratos más allegados a los cuerpos celulares amacrinos y más internamente, la sublamina b, formada por los tres estratos que lindan con la CGR. Como consecuencia, los canales ON y OFF llegan separados a través de las células ganglionares hacia el cerebro. Desde la plexiforme interna, el estímulo alcanza las células ganglionares, que son las únicas cuyos axones abandonan la retina para formar el nervio óptico y transmitir la información hasta los núcleos retino-recipientes del cerebro 12 . La retina de la rata, como todos los vertebrados, proyecta a seis grandes regiones subcorticales: el núcleo supraquiasmático, el núcleo geniculado lateral, el núcleo pregeniculado, la región del pretectum, el sistema óptico accesorio y el colículo superior. En la rata, en contraposición con el gato y el mono, las principales proyecciones de las CGR en el cerebro se realizan al colículo superior y al núcleo geniculado (Nadal-Nicolás FM, 2009; Ortín-Martínez A., 2015).

8.2. Objetivos

El objetivo principal de este estudio fue analizar la retina de la rata adulta Sprague Dawley (SD) con técnicas funcionales y morfométricas tanto “*in vivo*” como “*ex vivo*”, tras inducir una hipertensión ocular aguda (HTOA). “*In vivo*”, utilizaremos técnicas electrofisiológicas de registro del electrorretinograma (ERG) de campo completo para examinar

la funcionalidad de la retina, y estudiaremos la variación del espesor retiniano con Tomografía de Coherencia óptica. “*Ex vivo*”, utilizaremos técnicas morfométricas para analizar en cortes histológicos radiales el espesor de la retina e identificar diferentes subtipos celulares.

8.3. Materiales y métodos

8.3.1. Diseño experimental

Utilizamos un total de 41 ratas SD y diseñamos cuatro grupos experimentales que se analizaron a los 3, 7, 15 ó 30 días, más un grupo de animales intactos (n=9). El primer grupo (grupo de 3 días; n=7) se analizó con OCT a las 24 y 72 horas de la lesión y se sacrificó para su análisis histológico. El segundo grupo (grupo de 7 días; n=10) se analizó con ERG de campo completo a 1, 3 y 7 días y posteriormente se sacrificó para su examen histológico. El tercer grupo (grupo de 15 días; n=6) se analizó con OCT a 1, 3, 7 y 15 días de la lesión, y también se le realizó ERG de campo completo a los 15 días, posteriormente se analizó histológicamente. El cuarto y último grupo (grupo de 30 días; n=9), se analizó con OCT a los 3, 7, 15 y 30 días tras la lesión y también se le realizó ERG de campo completo a los 30 días.

8.3.2. Modelo de hipertensión ocular aguda

Una vez anestesiados los animales se colocaron en mordedores. Para aumentar la presión intraocular se conectó, mediante una aguja de calibre 30G insertada en la cámara anterior del ojo izquierdo, un sistema hidrostático de perfusión conectado a una botella de plástico de 500 ml de solución salina estéril. El ojo derecho se utilizó como control. Al ele-

var la botella de suero a una altura de 150 centímetros por encima del nivel del ojo, y como consecuencia de la presión hidrostática de la columna de agua, la PIO se elevó de los 8-10 mmHg que tiene en condiciones normales, a los 70-80 mmHg, aproximadamente. La PIO se mantuvo uniforme y constante durante 90 minutos. Pasados los 90 minutos, la aguja se retiró de la cámara anterior y la PIO volvió rápidamente a los valores previos a la cirugía (entre 8 y 10 mmHg). a medida de la PIO se realizó con un tonómetro de rebote y contacto (TonoLab®; Tiolat Oy, Helsinki, Finlandia).

8.3.3. Electrorretinografía de campo completo

Para la realización del ERG, los animales se adaptaron a la oscuridad durante doce horas. En la sala se utilizó luz de onda larga (luz roja), que ellos no pueden percibir por lo que siguen en condiciones escotópicas. En primer lugar, los anestesiados intraperitonealmente, y se le indujo midriasis pupilar instilándoles una gota en sendos ojos de tropicamida al 1 % (Colicursi tropicamida 1 %®; Alcon-Cusí, S.A., El Masnou, Barcelona, España). Realizamos un protocolo de estimulación, siguiendo las pautas que dicta la ISCEV (International Society for Clinical Electrophysiology of Vision). Se registraron: i) Registro de la respuesta pSTR y nStr por medio de estímulos luminosos de intensidad muy baja (entre -4.70 y $-4.10 \log \text{cd}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^2$). ii) Registro de la respuesta de bastones por medio de estímulos de intensidad baja (entre -3.60 y $-2.60 \log \text{cd}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^2$) iii) Registro de la respuesta mixta (bastones y conos), por medio de estímulos luminosos de gran intensidad (hasta $2 \log \text{cd}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^2$). iv) Registro de la respuesta de conos, obtenido tras los registros escotópicos, se adaptó al animal a condiciones fotópicas durante 5 minutos por medio de una iluminación de fondo de $30 \text{cd}\cdot\text{m}^{-2}$, como marca la ISCEV. Esta respuesta se obtuvo por medio de estímulos luminosos de gran intensidad ($2 \log \text{cd}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^2$).

8.3.4. Tomografía de coherencia óptica

A los diferentes tiempos de estudio, tras la HTOA, se realizaron tomografías de coherencia óptica de dominio espectral (SD-OCT) en los animales experimentales. Primeramente, se anestesiaron a los animales y se le instiló una gota de tropicamida al 1 % en sendos ojos. Después se colocó una lente de contacto a medida en la córnea. Se obtuvieron las imágenes con un ángulo de exploración de 30° , y se tomaron 24 secciones centrales de la retina. Con el mismo software analizamos y cuantificamos los espesores retinianos de una forma manual.

8.3.5. Procesado, enucleación y secciones histológicas

Para poder cumplir parte de los objetivos de este trabajo, y estudiar morfológica y morfométricamente las diferentes poblaciones de células de la retina de los animales a experimentar, se procedió al procesado histológico de los diferentes grupos experimentales. Una vez transcurrido el intervalo de supervivencia de cada uno de los grupos, los animales se anestesiaron profundamente y se sacrificaron con 1ml i.p. de pentobarbital sódico al 20 % (Dolethal®), Vetoquinol S.A., Lure, Francia), para la perfusión intracardiaca. En primer lugar, se colocó el animal en decúbito supino bajo una campana de extracción de gases. Posteriormente, se cortó la piel desde el apéndice xifoides hacia los hombros. Se realizó una esternotomía y se seccionó el diafragma y las costillas desde la línea esternal media, hacia las clavículas. Una vez abierta la caja torácica y expuesto corazón y vasos se separó el pericardio. Hecho esto, se seccionó el ápice del ventrículo izquierdo (con unas tijeras de punta fina) y se introdujo una cánula rígida de 14G hasta la aorta ascendente, que se conectó a una bomba peristáltica (ISM827, Ismatec S.A., Zurich, Suiza). Seguidamente se seccionó la aurícula derecha para que se desangrara el animal. Primero, se perfundió al animal con suero salino al 0,9 % para eliminar los restos

sanguíneos, y seguidamente se perfundió con una solución de paraformaldehído al 4% en tampón fosfato (PB) 0,1M (Ph 7.2-7.4) a 4°C para la fijación. Una vez perfundidos los animales, se procedió a la enucleación de ambos ojos. Para obtener secciones histológicas transversales de retina, una vez extraído el ojo se disecó la copa óptica. El tejido se crioprotegió por inmersión en sacarosa en soluciones crecientes de sacarosa (Panreac Química S.A. Barcelona, España), al 15% y al 30% en PB durante 8 y 24 horas, respectivamente a 4 o C. A continuación, la copa óptica se embebió en medio de montaje óptimo para congelación (Tissue-Tek® O.C.TTM; Sakura, Finetek U.S.A, Inc., Torrance, CA, EE.UU), manteniendo en todo momento la orientación correcta. Para ello, se conservaba la parte del párpado que contiene la sutura en el polo superior y el músculo recto superior y se congelaban rápidamente en isopentano preenfriado a -70° C. Seguidamente, se obtuvieron secciones histológicas de 16 μm de espesor con ayuda de un criostato, las cuales fueron utilizadas para su examen al microscopio de fluorescencia. Estos cortes se realizaban en el plano horizontal y contenían la cabeza del nervio óptico en la región más central del corte, así como regiones centrales (próximas a la cabeza del NO), y periférica de la región nasal y temporal del corte. En estas dos regiones de cada aspecto (nasal o temporal) se procedió a realizar el examen cualitativo y cuantitativo de las células bipolares; así como a medir el espesor y el área de las capas de la retina.

8.3.6. Inmunohistofluorescencia

Este procedimiento se basa en la utilización de anticuerpos que se unen específicamente al antígeno que se quiere identificar, en nuestro caso a las células del tejido retiniano que expresan recoverina ó proteína kinasa c (pkc α), además se hizo una contratinción con DAPI, que identifica los núcleos celulares. Todas las inmunofluorescencias se realizaron siguiendo los protocolos previamente utilizados en nuestro laboratorio (Galindo-

Romero C et al., 2011; Nadal-Nicolás FM, Salinas-Navarro M, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M, 2015).

8.3.7. Adquisición de imágenes

Todos y cada uno de los ojos analizados se observaron y fotografiaron en un microscopio de fluorescencia (Axioscop 2 Plus; Zeiss Mikroskopie, Jena, Alemania) equipado con diversos filtros y una cámara digital de alta resolución (ProgRes C10, Jenoptik, Jena, Alemania). Analizamos 3 secciones transversales de la retina de cada ojo. Para el análisis estructural de las 3 secciones de las retinas se fotografiaron 4 zonas representativas de cada sección transversal (superior periferia, superior central, inferior central e inferior periferia) utilizando el objetivo 20X y los 3 filtros; el ultravioleta que permite la observación del DAPI y dos de fluorescencia: uno que permite la observación de los anticuerpos conjugados en rojo (células bipolares de cono, núcleos de fotorreceptores y procesos axonales de bipolares de cono en la plexiforme interna) y otro que permitió ver los anticuerpos conjugados en verde (células bipolares de bastón). Todas ellas se capturaron de tal manera que se obtuvo el mismo campo microscópico.

8.3.8. Cuantificación del espesor de la totalidad de la retina y la retina interna

Se analizó a través del programa Image-Pro®Plus5.1. El espesor de la retina total y el de la retina interna se midió en las cuatro regiones de las que se había hecho fotomicrografías (superior periferia, superior central, inferior central, inferior periferia).

Para el espesor de la retina total, mediante un trazado de líneas, fuimos

siguiendo el contorno de la porción interna de la capa de las fibras hasta la porción externa de los segmentos externos de los fotorreceptores. Para la retina interna, se utilizó el mismo procedimiento, pero esta vez, se midió desde la porción interna de la capa de las fibras nerviosas hasta la porción externa de la capa nuclear interna. Así pues, obtuvimos una medición del espesor total de la retina y una segunda medición que involucra a la retina interna.

8.3.9. Análisis estadístico

Los datos registrados fueron procesados y almacenados en hojas de cálculo (Microsoft® Office Excel 2016, Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA). Estos datos fueron exportados al programa SigmaPlot® 11.0 para Windows® (Systat Software, Inc., Richmond, CA, USA), para su análisis estadístico. Para el análisis entre grupos se utilizó el test de análisis de varianza (ANOVA).

8.4. Resultados

8.4.1. Caracterización “*in vivo*” la retina de la rata adulta tras un ataque de hipertensión ocular aguda (HTOA)

A continuación, vamos a exponer los resultados obtenidos en los registros electroretinográficos. Hablaremos en porcentaje para su mejor entendimiento y compararemos los ojos izquierdos con los controles, ya que no obtuvimos diferencias significativas con respecto a los ojos contralaterales. Todos los registros electroretinográficos de cada uno de los apartados se pueden ver en la Figura 8.1.

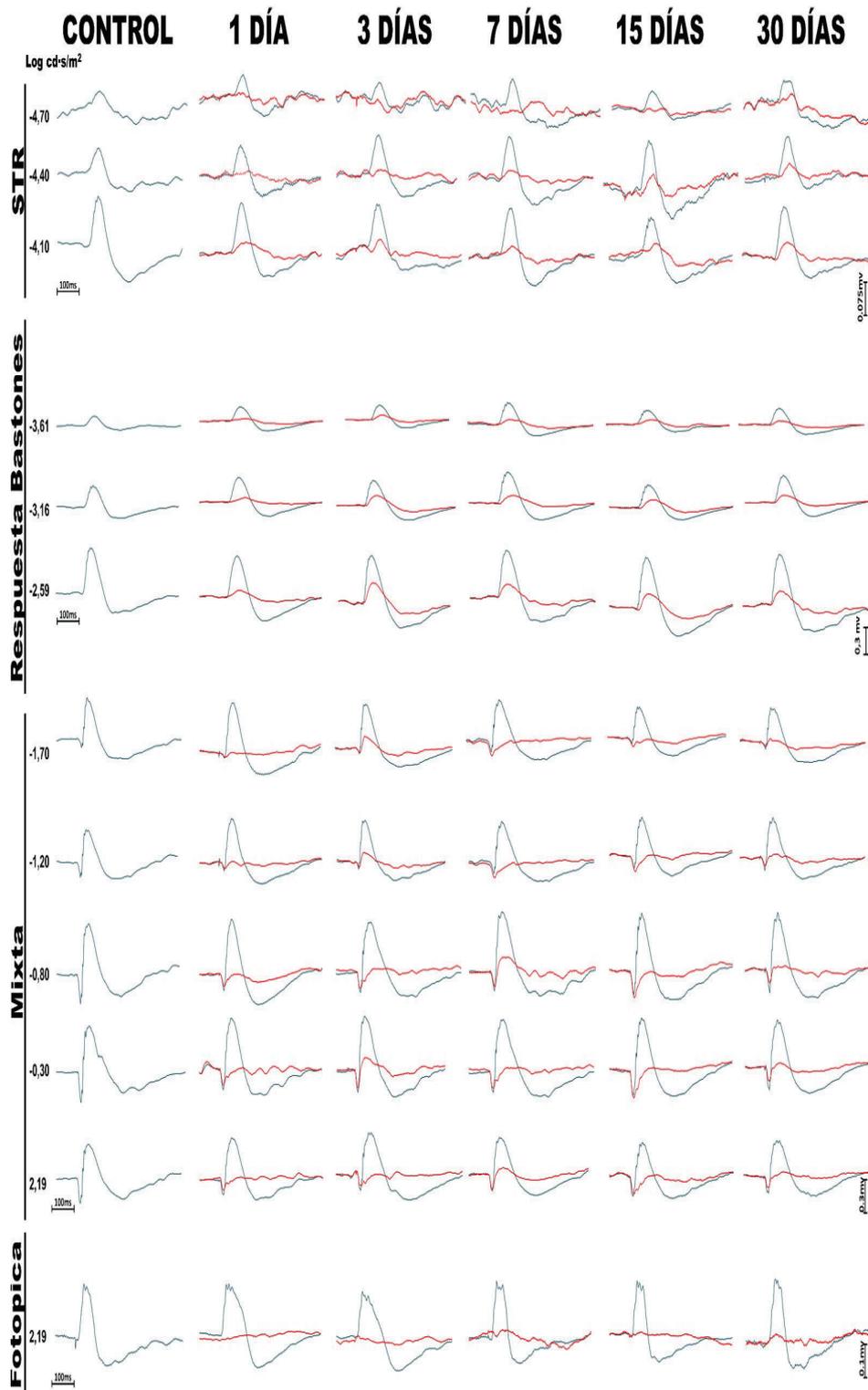


Figura 8.1: Electroretinografía

Respuesta umbral escotópica (STR)

Esta respuesta está formada por un componente positivo (pSTR) y de otro negativo (nSTR). Los registros de ERG, a las 24 horas de haber inducido la HTOA ya estaban considerablemente reducidos. El componente positivo de la pSTR, se redujo un $75 \pm 15\%$, a las 24 horas. Esta reducción significativa (One-way ANOVA $p < 0,05$), se mantuvo durante todos los tiempos de supervivencia. Lo mismo ocurrió con la nSTR que se redujo en $70 \pm 5\%$, con respecto a los animales control (One-way ANOVA $p < 0,05$).

Valores de la amplitud de la onda a del ERG de campo completo, antes y tras la HTOA ratas albinas

En animales experimentales en las primeras 24 horas después de la lesión, esta onda se redujo al $47,5 \pm 13\%$, y se mantuvo al menos hasta los 3 días después de la lesión. A los 7 días, se obtuvo una leve recuperación de esta onda y pasó a ser del $73 \pm 16\%$, quedando estabilizada hasta el último tiempo de supervivencia, 30 días.

Valores de la amplitud de la onda b del ERG de campo completo, antes y tras la HTOA ratas albinas

En animales experimentales en las primeras 24 horas después de la lesión, esta onda se redujo al $23 \pm 8,7\%$, y se mantuvo constante en todos los tiempos estudiados tras la lesión.

Valores de la amplitud de la onda b del ERG de campo completo, adaptando al animal a condiciones fotópicas, antes y tras la HTOA ratas albinas

Para hacer el registro del ERG en condiciones fotópicas, se tuvo que adaptar al animal a condiciones fotópicas durante 5 minutos a 30 cd/m^2 , como establece la ISCEV. A las 24 horas de la lesión y manteniéndose constante, la amplitud de esta onda disminuyó un $90,5 \pm 3,2 \%$.

Tiempo implícito antes y después de la HTOA, a los diferentes tiempos estudiados

Para el tiempo implícito se tomaron los valores, en segundos, desde que se da el impulso de luz, hasta el pico máximo de la onda b escotópica. En animales normales, con la intensidad más baja que se dio, se obtuvo una respuesta a los $0,105 \pm 0,007$ segundos. Esta respuesta se fue haciendo más rápida con forme iba aumentando la intensidad del estímulo hasta llegar $0,067 \pm 0,004$ segundos, a la intensidad de $2,19 \log \text{ cd}\cdot\text{s/m}^2$. En cambio, en los animales experimentales, se obtuvieron diferencias significativas (ANOVA $p \leq 0,05$) con respecto a los ojos derechos y el control. El tiempo implícito, aumento en un $36,1 \pm 7,8 \%$, es decir, en los ojos izquierdos obtuvimos una respuesta más tardía que en los ojos derechos y los controles.

Análisis cuantitativo del espesor “*in vivo*” de la retina tras HTOA con Tomografía de Coherencia Óptica (OCT). Para cuantificar el espesor de la retina “*in vivo*” a los diferentes tiempos de estudio, utilizamos la OCT. Analizamos tres secciones: 1500 micras superior al NO, justo en el NO y 1500 micras inferior al nervio. En cuanto al espesor de retina total, en los ojos derechos, los que no han sido lesionados, el espesor fue de $216,4 \pm 3,4 \mu\text{m}$. En cambio, en los ojos lesionados, hubo un adel-

gazamiento progresivo, hasta reducirse a $161,2 \pm 9,1\mu m$ a los 30 días después.

En retina interna, este adelgazamiento fue mucho más acusado. A las 72 horas del insulto ya hubo cambios estadísticamente significativos (One-way ANOVA $p < 0,05$). De $85,9 \pm 2,2\mu m$ del ojo derecho, a los 30 días la retina interna se encontraba en $33,2 \pm 6,5\mu m$ (Fig. 8.2).

8.4.2. Análisis morfométricos de la retina “*ex vivo*”

Como hemos indicado en el apartado de “materiales y métodos” de esta memoria; para realizar la medida de los espesores “*ex vivo*”, se delimitaron los bordes de las diferentes capas, y automáticamente el programa mostraba la media del espesor. Estas medidas se hicieron todas sobre la tinción con el anticuerpo de la recoverina, que nos permitió ver la capa de las fibras nerviosas, ya que la contratación con DAPI no las teñía. En las medidas de los espesores de retina total, en los animales control el espesor medio fue de $150 \pm 11\mu m$. Se encontraron diferencias significativas a los 7 días de la lesión, donde la retina tuvo un adelgazamiento, llegando a las $113 \pm 13\mu m$. Este espesor se mantuvo a los 15 días, encontrando diferencias significativas de nuevo, a los 30 días donde la retina midió 86 ± 6 (One-way ANOVA $p < 0,05$). En retina interna, encontramos las mismas diferencias significativas (One-way ANOVA $p < 0,05$), que en los espesores de la retina total. Los animales control, tenían un espesor medio de retina interna de $75 \pm 5\mu m$. A los 7 días, y manteniéndose hasta los 15, los animales tenían un espesor medio de $43 \pm 7\mu m$. A los 30 días de la lesión, la retina interna midió $32 \pm 3\mu m$.

En retina externa, no encontramos cambios significativos, hasta 30 días después de haber inducido la lesión, disminuyendo un 32 %.

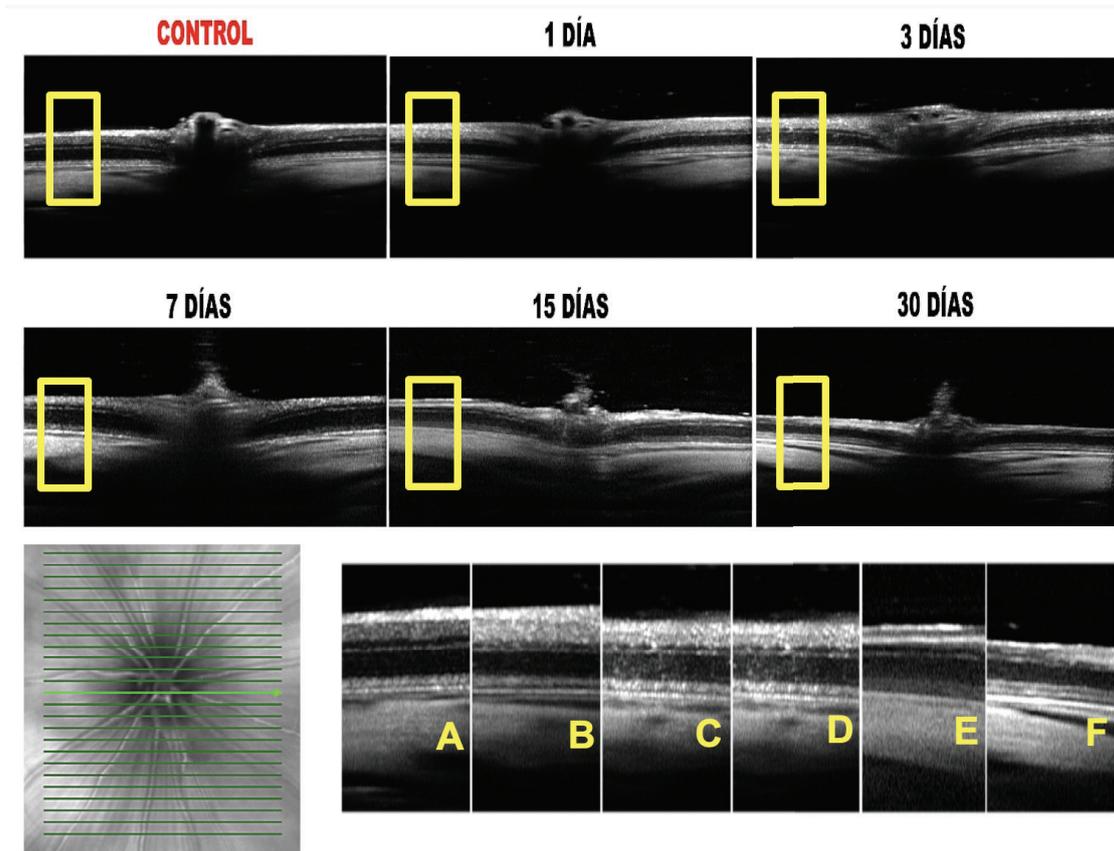


Figura 8.2: Tomografía de coherencia óptica. Tomas de OCT de secciones del NO de animales representativos a los diferentes tiempos estudiados (Zona superior). Ampliaciones de las secciones superiores, dónde se aprecia la reducción de los espesores (Zona inferior izquierda). Fondo de ojo de la rata, dónde se muestra la sección (flecha verde) de las fotografías de arriba (Zona inferior izquierda).

Análisis cuantitativo de las subpoblaciones de células bipolares de la retina

Población de células bipolares de cono

Para analizar esta población de células, punteamos manualmente cada una de estas células que presentaba inmunoreactividad contra el anticuerpo recoverina, de cada sección de la retina, de las que tomamos microfotografías. No observamos diferencias significativas entre el control y el ojo derecho con una media de células por sección de 30 ± 4 CBC. En los ojos izquierdos, con respecto al control, obtuvimos diferencias significativas a todos los tiempos de estudio (One-way ANOVA $p < 0,05$). A los 3 días, ya hubo diferencias significativas en esta población de células. A los 7 días también encontramos diferencias con respecto al control. No hubo diferencias entre el grupo de 7 días y el de 15 días, pero sí con el grupo de 30 días, cuando la población de CBC era de 13 ± 3 por sección (Figura 8.3).

Población de células bipolares de bastón

De la misma manera que contabilizamos la población de CBC, lo hicimos con las CBB que expresan $pkc-\alpha$. No se observaron diferencias significativas en los ojos derechos con respecto al control, con una población media por sección de 66 ± 7 CBB, a ninguno de los tiempos estudiados; como tampoco las encontramos entre los ojos controles con los ojos lesionados, con una población media de 68 ± 8 CBB, en ninguno de los tiempos de supervivencia de los animales (Figura 8.3).

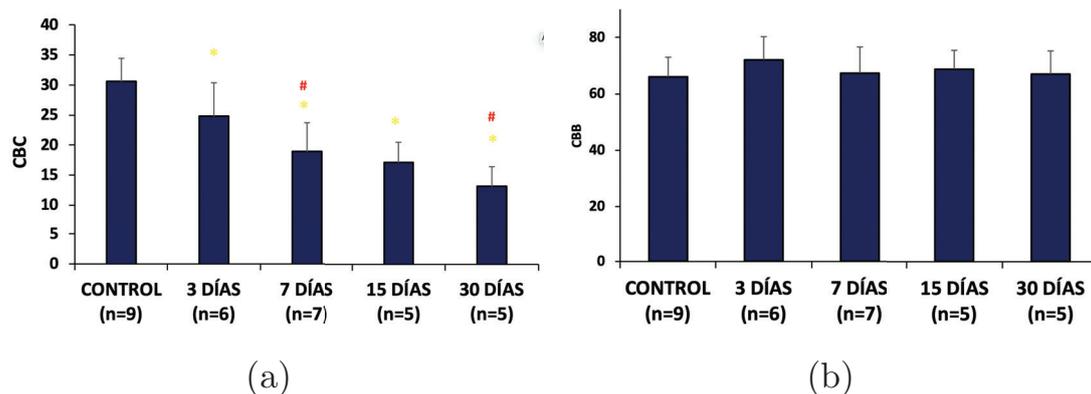


Figura 8.3: Supervivencia de la población de CBC Y CBB. (a) Valores medios + DE de población de CBC inmunoteñidas con recoverina por cada sección obtenida al microscopio, de todos los tiempos de estudio. * Diferencias significativas con el grupo control. # Diferencias significativas con el grupo experimental anterior. (b) Valores medios + DE de población de CBB inmuneñidas con $pkc-\alpha$, por cada sección obtenida al microscopio, de todos los tiempos de estudio.

Análisis cualitativo de los cortes histológicos, con los marcadores de recoverina, $pkc\alpha$ y DAPI

En animales control, al observar al microscopio las secciones de los cortes histológicos inmunoteñidas con recoverina, se pudo apreciar las células bipolares de cono, sus somas y sus procesos axonales, distribuidos uniformemente por la CNI. Además, se podía observar dos subláminas diferentes de la CPI, donde llegaban los terminales axonales de las bipolares, pudiendo así saber si eran CBC-ON u OFF (Fig. 8.4). En los animales experimentales, a los 3 días de la lesión, se pudieron apreciar ya zonas visiblemente dañadas de la sublámina ON más próxima a la CFN, y también se apreciaron menor número de CBC. A los 7 días de la lesión, el número de CBC, aparecía reducido significativamente, la NI se había reducido considerablemente y sólo se atisbaban algunas pequeñas zonas de la sublámina ON de la PI y la sublámina OFF empezaba a deteriorarse. A los 15 días, las imágenes fueron similares al grupo de los

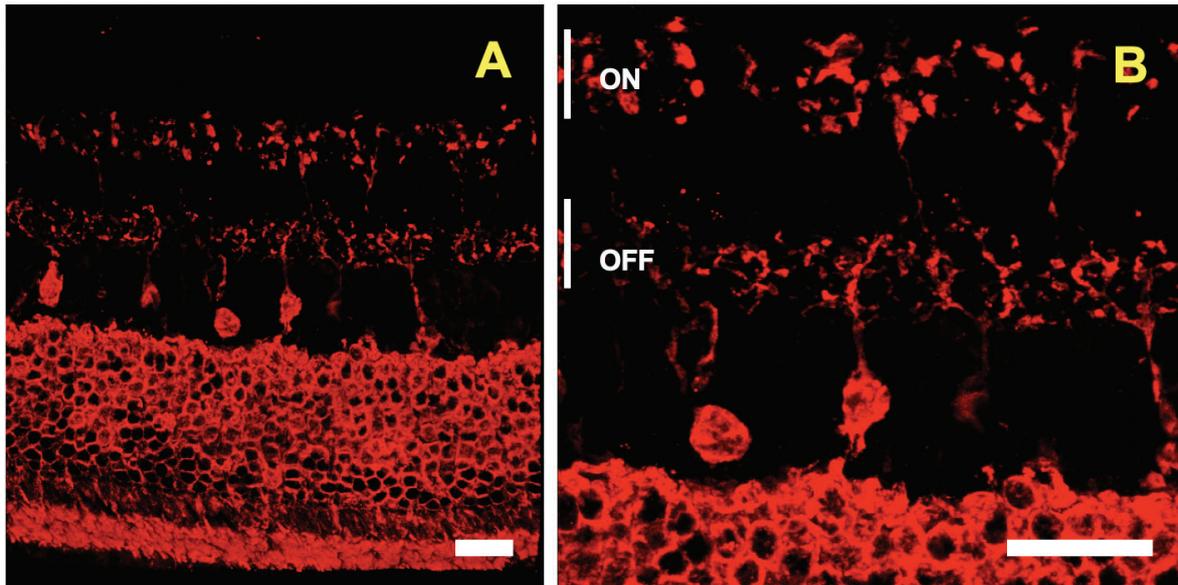


Figura 8.4: Imágenes de la retina de la rata teñidas con recoverina en confocal (60x). A; Fotografía tomada con el microscopio confocal (60x) de un corte histológico de la retina control inmunoteñido con recoverina. Se aprecian las células bipolares de cono marcadas con recoverina de manera muy intensa o de forma más tenue, las dos subláminas de la plexiforme interna, núcleos de fotorreceptores y segmentos externos de bastón. B; Aumento de la misma sección que la anterior (Zoom=2), donde se aprecia el soma de las CBC y sus procesos axonales, terminando en la sublámina ON u OFF. Barra = $20\mu m$.

7 días, donde el número de CBC estaba significativamente reducido con respecto al control, la NI aparecía sensiblemente adelgazada, pocos eran los restos de sublámina ON de la PI, y la sublámina OFF estaba ampliamente dañada. A los 30 días de la lesión, pocas eran ya las CBC que se pudieron contabilizarse, el espesor de NI aparecía muy reducido, la sublámina ON de la PI había desaparecido, y poco es lo que quedaba de la sublámina OFF (Fig. 8.5, A'-E'; A''-E'').

De la misma forma que con el anticuerpo de recoverina, lo hicimos con el anticuerpo $pkc-\alpha$. En animales controles, en la zona inferior su apreciaba un marcaje intenso que aparece como una línea, y en realidad

correspondía a las terminaciones dendríticas de las células bipolares de bastón, que conectan los pedículos de los bastones. Un poco por encima se aprecia los cuerpos celulares de las bipolares de bastón, cuyo contorno pudo apreciarse perfectamente delineado por la inmunoreactividad anti-PKC- α . Estos cuerpos celulares se distribuían en el espesor de la capa nuclear interna y mayoritariamente se situaban en la región externa de esta capa. En medio de esta capa también se pudo ver cuerpos celulares amacrinicos en medio de los terminales axonales de las CBB. En la parte superior de las micrografías, se apreciaban los terminales axonales de las CBB que ramifican en la porción más interna de la plexiforme interna, formando una subdivisión adicional de la sublámina ON de la plexiforme interna (Fig. 8.5, A''-E'').

En los animales experimentales, pudimos observar que la población de las CBB, aparentemente no tuvo cambios, en ninguno de los tiempos estudiados. Lo que si cambió fue el espesor de la NI, como se apreció con la recoverina. También se observó como la intensidad de la inmunofluorescencia de la plexiforme interna se fue reduciendo hasta el último grupo experimental, el de los 30 días (8.5, A''-E'').

En la tinción con DAPI, aparte de la reducción de la NI ya mencionada, también observamos la reducción que parece haber a partir de los 15 días en la PE, y la desestructuración de la misma. También se aprecia la disminución de núcleos celulares en la CCGR, a lo largo de los tiempos de supervivencia (8.5, A'''-E''').

8.5. Conclusiones

Fundamentándonos en los resultados obtenidos de los experimentos “*in vivo*” y “*ex vivo*” de la retina de la rata, tanto externa como interna de una manera funcional y morfométrica, a diferentes intervalos de supervi-

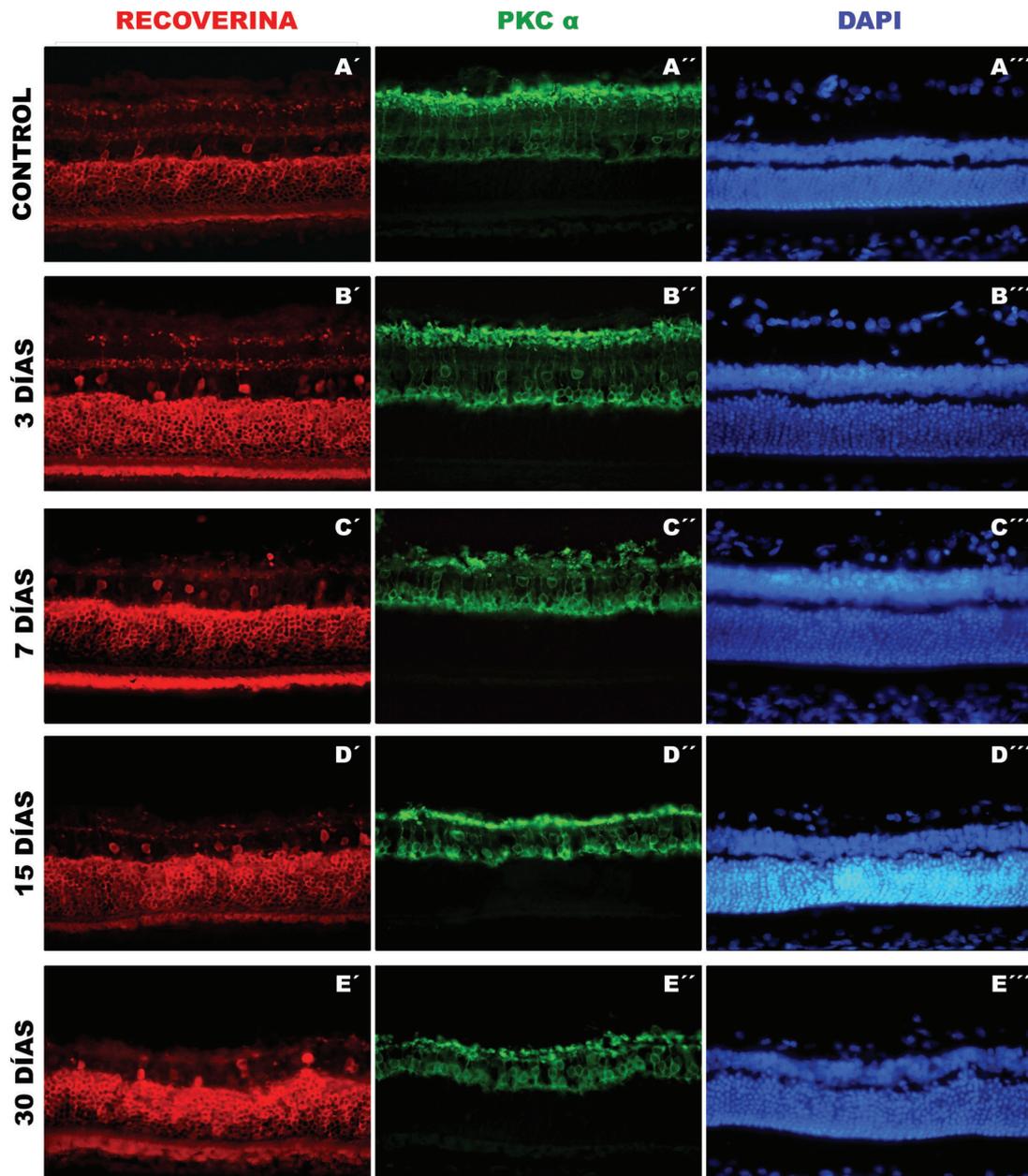


Figura 8.5: Estudio microscópico con tres tinciones. Microfotografías tomadas a 40X de la sección central de cinco cortes histológicos inmuneñidos con recoverina, $pkc\alpha$ y DAPI. En el margen izquierdo los diferentes grupos experimentales y el control. En la parte superior, indicadas en las columnas los distintos anticuerpos (recoverina y $pkc\alpha$) y la contratinción con DAPI. A', A'' Y A''' grupo control; B', B'', B''' grupos de los 3 días de supervivencia tras HTOA; C', C'', C''' grupos de los 7 días de supervivencia tras HTOA; D', D'', D''' grupo de los 15 días de supervivencia tras la HTOA; E', E'', E''' grupo de los 30 días de supervivencia tras la HTOA. Barra= $20\mu m$

vencia tras inducir HTOA, expuestos en esta Tesis de Máster, podemos concluir que la HTOA produce:

1. Daños funcionales en retina externa, con una disminución a las 24 horas de la lesión de la onda a.
2. Daños funcionales en la retina interna, con una disminución a las 24 de la lesión de las ondas b y STR en el registro escotópico, y de la onda b en el registro fotópico.
3. Una disminución del espesor de la retina interna, que se pudo apreciar en el examen “*in vivo*” con OCT a los 3 días de la lesión y en el examen “*ex vivo*” en cortes histológicos a los 7 días de la lesión.
4. Una disminución del espesor de la retina externa que se apreció en el examen “*ex vivo*” en cortes histológicos a los 30 días de la lesión.
5. Pérdida progresiva de la población de CBC marcadas con recoverina, pero no de la población de CBB marcadas con $\text{pkc-}\alpha$.

8.6. Referencias

Alarcón-Martínez L, Avilés-Trigueros M, Galindo-Romero C, Valiente-Soriano J, Agudo-

Barriuso M, Villa Pde L, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M. ERG changes in albino and pigmented mice after optic nerve transection. *Vision Res.* 2010 Oct 12;50(21):2176-87.

Alarcón-Martínez L, de la Villa P, Avilés-Trigueros M, Blanco R, Villegas-Pérez MP, Vidal-

- Sanz M. Short and long term axotomy-induced ERG changes in albino and pigmented rats. *Mol Vis.* 2009 Nov 17; 15:2373-83.
- Bui BV, Fortune BJ. Ganglion cell contributions to the rat full-field electroretinogram. *J. Physiol.* 2004; 555(Pt 1): 153-173.
- Cioffi, G. Glaucoma. 1st ed. San Francisco, CA: American Academy of Ophthalmology; 2011.
- Cuenca N, Ortuño-Lizarán I, Pinilla I. Cellular Characterization of OCT and Outer Retinal Bands Using Specific Immunohistochemistry Markers and Clinical Implications. *Ophthalmology.* 2018 Mar;125(3):407-422.
- Dietlein TS, Hermann MM, Jordan JF. The Medical and surgical Treatment of Glaucoma.
- Deutsches Arzteblatt Internacional. *Dtsch Arztebl Int* 2009; 106:597-605.
- Fishman GA. The Electroretinogram. En: "Electrophysiological Testing in disorders of retina, optic nerve and visual pathway".
- Fishman GA, Bich DG, Holder GE, Brigell MG. Ed. The Foundation of the American Academy of Ophthalmology. San Francisco (California, USA). 2001; Pp 1-155
- Frishman LJ, Steinberg RH. Intraretinal analysis of the threshold dark-adapted ERG of cat retina. *J Neurophysiol.* 1989a; 61(6):1221-1232.
- Frishman LJ, Steinberg RH. Light-evoked increases in $[K^+]_0$ in proximal portion of the dark-adapted cat retina. *J Neurophysiol.* 1989b; 61(6): 1233-1243.
- Galindo-Romero C, Avilés-Trigueros M, Jiménez-López M, Valiente-Soriano FJ, Salinas-Navarro M, Nadal-Nicolás F, Villegas-Pérez MP, Vidal-

Sanz M, Agudo-Barriuso M.

Axotomy-induced retinal ganglion cell death in adult mice: quantitative and topographic time course analyses. *Exp Eye Res.* 2011; 92:377-387.

Hubel David H. *Ojo, cerebro y visión.* Murcia-España. FG Graf, S.L. 2000

Kolb H, Goede P, Roberts S, McDermott R, Gouras P. Uniqueness of the S-cone pedicle in the human retina and consequences for color processing. *J Comp Neurol.* 1997; 386:443– 460.

Kolb H. The organization of the outer plexiform layer in the retina of the cat: electron microscopic observations. *J Neurocytol.* 1977; 6:131–153.

Mariani AP. Bipolar cells in monkey retina selective for the cones likely to be blue-sensitive. *Nature.* 1984; 308:184–186.

Nadal-Nicolás FM, Jiménez-López M, Sobrado-Calvo P, et al. Brn3a as a marker of retinal ganglion cells: qualitative and quantitative time course studies in naive and optic nerve- injured retinas. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009; 50: 3860–3868.

Nadal-Nicolás FM, Salinas-Navarro M, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M. Two methods to trace retinal ganglion cells with fluorogold: from the intact optic nerve or by stereotactic injection into the optic tract. *Exp Eye Res.* 2015 Feb; 131:12-9

Ortín-Martínez A, Salinas-Navarro M, Nadal-Nicolás FM et al. Laser-induced ocular hypertension in adult rats does not affect non-RGC neurons in the ganglion cell layer but results in protracted severe loss of cone-photoreceptors. *Exp Eye Res.* 2015; 132: 17–33.

Vizzeri, G., Kjaergaard, S. M., Rao, H. L. y Zangwill, L. M. Role of imaging in glaucoma diagnosis and follow-up. *Indian J. Ophthalmol.* 2011; 59(1), 59-68.