

UNIVERSIDAD DE MURCIA
DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA Y MEDICINA ANIMAL

ELECTRORRETINOGRAFÍA EN LA IGUANA VERDE (*Iguana iguana*)

Memoria de Tesis presentada por el Licenciado Ramón Miguel Almela
Sánchez, para optar al grado de Doctor en Veterinaria

Murcia, mayo de 2007

D. ALEJANDRO BAYÓN DEL RÍO, Profesor Titular del Departamento de Medicina y Cirugía Animal de la Universidad de Murcia, y **D. JESÚS TALAVERA LÓPEZ**, Profesor Asociado tipo 3 del Departamento de Medicina y Cirugía Animal de la Universidad de Murcia,

INFORMAN:

Que la Tesis Doctoral titulada “**ELECTRORRETINOGRAFÍA EN LA IGUANA VERDE (*Iguana iguana*)**”, de la que es autor el Licenciado en Veterinaria **Ramón Miguel Almela Sánchez**, ha sido realizada bajo nuestra dirección, en el Departamento de Medicina y Cirugía Animal de la Universidad de Murcia y, en nuestra opinión, esta memoria reúne las condiciones legales precisas para optar al Título de Doctor en Veterinaria.

Murcia, 24 de mayo de 2007

Fdo.: Alejandro Bayón del Río

Fdo.: Jesús Talavera López

D^a. Ana Maria Montes Cepeda, Profesora Titular de Universidad del Área de Medicina y Cirugía Animal y Director del Departamento de Medicina y Cirugía Animal, INFORMA:

Que la Tesis Doctoral titulada “Electrorretinografía en la Iguana Verde (Iguana iguana)”, ha sido realizada por D. Ramón Miguel Almela Sánchez, bajo la inmediata dirección y supervisión de D. Alejandro Bayón del Río y D. Jesús Talavera López, y que el Departamento ha dado su conformidad para que sea presentada ante la Comisión de Doctorado.

Murcia, a 28 de mayo de 2007

AGRADECIMIENTOS

Lo que más agradezco es el hecho que las personas que aparecen en esta sección no son compromisos, sino personas comprometidas con todo el trabajo relacionado con la consecución de esta tesis y, además, con un fuerte componente fuera de lo puramente académico que se traduce en relaciones de amistad. Por eso, quiero expresar mi más sincero agradecimiento:

Al Dr. D. Alejandro Bayón del Río por su gran dirección y dedicación, por confiar en mí en un proyecto que nació de él y por ser un maestro para mí en el campo profesional.

Al Dr. D. Jesús Talavera López por su excelente trabajo, ayuda y dirección de esta tesis.

A la Dra. D^a M^a Josefa Fernández del Palacio por lo imprescindible de sus aportaciones a la tesis y por todas las veces que me ha guiado.

Al Dr. D. Miguel Motas Guzmán que también me ha ayudado en la consecución de este trabajo.

Al Dr. D. Ángel Pausides Albert Soriano por sus colaboraciones.

A mis padres, Ramón e Isabel, por ser referencia, por su ilusión en este proyecto y por su aliento permanente.

A mi hermano Moisés por aportarme experiencia y por sus traducciones.

A Cristina Clavel Claver por su apoyo incondicional y paciencia innagotable para que lograra terminar este proyecto y parte imprescindible en lo emocional.

A Tomás y a Gonda, ellos me aportan seguridad y fuerza.

A Agnese Cozzi por su inestimable ayuda en la realización de los exámenes electroretinográficos.

Al resto de amigos, a todas aquellas personas que, de un modo u otro, han ayudado, en algún momento, a la realización de esta tesis, y a Keya, Simba y Linda.

**A mis padres y a mi hermano
porque a ellos les debo, sin lugar a duda,
no solamente lo que soy,
sino todo lo que he conseguido.**

***Si uno no puede explicar lo que ha estado
haciendo, su trabajo carecerá de valor.***
Erwin Rudolf Josef Alexander Schrödinger.
(Premio Nobel Física 1933)

***Nuestra cabeza es redonda para permitir
al pensamiento cambiar de dirección.***
Francis-Marie Martínez Picabia.
(Pintor Impresionista)

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
1. Principales datos biológicos de la <i>Iguana iguana</i>	5
2. El órgano de la visión.....	5
3. Estructura y funcionamiento de la retina.....	6
3.1. El epitelio pigmentario y las funciones que desempeña.....	8
3.2. Las células fotorreceptoras.....	9
3.3. La transducción visual en los fotorreceptores.....	14
3.4. La etapa de transmisión.....	17
3.5. La membrana limitante externa.....	19
3.6. La capa nuclear externa.....	20
3.7. Las células horizontales.....	21
3.8. Las células bipolares.....	23
3.9. La capa plexiforme externa.....	28
3.10. Las células amacrinas.....	29
3.11. Las células interplexiformes.....	31
3.12. Las células ganglionares.....	31
3.13. La capa nuclear interna.....	35
3.14. La capa plexiforme interna.....	35
3.15. La membrana limitante interna.....	36
3.16. Los elementos neurogliales de la retina.....	36
3.17. La fóvea.....	37
3.18. El soporte trófico vascular.....	38
3.19. Inervación de la retina.....	39
3.20. El tratamiento retiniano de la función visual.....	40

4. La técnica electroretinográfica.....	42
4.1. Parámetros a controlar.....	42
4.1.1. Características de la estimulación.....	43
4.1.2. Características del paciente y su preparación.....	45
4.1.3. Características del estado de adaptación de la retina en el momento del examen.....	45
4.1.4. Características de la recogida y del tratamiento de la señal.....	46
4.2. Interpretación de un ERG.....	47
4.2.1. La onda a	48
4.2.2. La onda b	49
4.2.3. La onda c	49
4.2.4. Los potenciales oscilatorios (POs) u ondas e	49
4.3. Indicaciones clínicas de la electroretinografía.....	50
5. El examen electroretinográfico en el perro.....	52
5.1. Evaluación de la función de los bastones.....	53
5.2. Evaluación de la función mixta: conos y bastones.....	54
5.3. Evaluación de la función de los conos.....	54
5.4. Otras indicaciones.....	54
5.5. Informe de resultados.....	55
6. El examen electroretinográfico en los reptiles.....	56
6.1. Anestesia y preparación de los animales.....	56
6.2. Obtención del ERG.....	57
6.3. Examen fotópico.....	57
6.4. Examen escotópico.....	58

6.5. Fusión del flicker.....	58
6.6. La electroretinografía en condiciones de hipotermia.....	58
MATERIALES Y MÉTODOS.....	59
1. Materiales.....	60
1.1. Animales.....	60
1.2. Aparataje y material accesorios.....	60
1.3. Sala de exploración.....	61
2. Métodos.....	61
2.1. Examen físico, hematología y bioquímica sanguínea.....	62
2.2. Exploración oftalmológica general.	62
2.3. Obtención de las medidas biométricas: peso y longitud narina-cloaca.....	63
2.4. Examen electroretinográfico.....	64
2.4.1. Preparación de los animales.....	64
2.4.2. Obtención de los electroretinogramas.....	65
2.4.3. Evaluación fotópica.....	65
2.4.4. Evaluación escotópica.....	65
2.5. Estudio estadístico.....	66
RESULTADOS.....	70
1. Biometría.....	71
2. Preparación de las iguanas.....	71
3. Examen electroretinográfico.....	71
3.1. Análisis cualitativo.....	71
3.2. Análisis cuantitativo.....	73
3.2.1. Influencia del peso y de la longitud narina-cloaca.....	73
3.2.2. Influencia del sexo.....	73

3.2.3. Comparación entre ojo derecho y ojo izquierdo.....	74
3.2.4. Influencia del tipo de estímulo.....	74
3.2.5. Relación entre los parámetros electroretinográficos.....	75
3.2.6. Relación entre onda a y onda b para los diferentes estímulos.....	75
DISCUSIÓN.....	97
CONCLUSIONES.....	108
RESUMEN.....	110
SUMMARY.....	113
BIBLIOGRAFÍA.....	116

INTRODUCCIÓN

La oftalmología veterinaria es un campo en el que se está avanzando rápidamente en los últimos años. Tal vez ha sido determinante para tal avance la incorporación de los desarrollos tecnológicos que se van produciendo en oftalmología humana, que han tenido como consecuencia que se conozcan mejor las patologías oculares y su tratamiento, ya sea médico o quirúrgico. Entre estos avances se encuentra la electroretinografía, que, aunque no es una técnica nueva, sí es cierto que, como herramienta de diagnóstico en la práctica clínica, ha mejorado mucho en los últimos años.

La historia de la electroretinografía se remonta a mediados del siglo XIX, cuando algunos investigadores constataron que el ojo de los vertebrados respondía a los estímulos lumínicos mediante cambios de potencial eléctricos que se originaban en la retina¹. Al principio, la medición de estos cambios de potencial eléctricos era muy rudimentaria y agresiva; no en vano, los electrodos usados eran agujas colocadas incluso en la cámara vítrea del ojo de los animales²⁻⁵.

Hoy en día la electroretinografía es una técnica de diagnóstico objetiva^{6,7}, no invasiva⁸⁻¹⁰, que se ha incorporado a la oftalmología veterinaria ya que permite la evaluación funcional y el diagnóstico de diferentes patologías de la retina en distintas especies animales^{1,6,11-23}.

La electroretinografía posee tres características importantes como técnica de diagnóstico. Una primera característica consiste en que la evaluación que se realiza se puede complementar con la visualización directa de la retina mediante oftalmoscopia, lo cual es una ventaja no extensible a otras técnicas electrodiagnósticas¹. La segunda característica radica en que permite la evaluación funcional de la retina en los casos en los que la oftalmoscopia del fondo ocular no es posible (distrofias corneales, opacificaciones de cristalino, hemorragias vítreas)^{1,21,24}. La tercera característica es su capacidad para evaluar las alteraciones de la retina a nivel funcional, antes incluso de la aparición de signos clínicos oftalmológicos^{1,6,19-21,24-28}.

Todas estas características hacen que la electroretinografía sea una técnica de diagnóstico clínico imprescindible en oftalmología. Hay que tener en cuenta que, aunque puedan existir en oftalmología veterinaria extrapolaciones entre especies de saurios de hábitos diurnos y otras especies de mamíferos más estudiadas, como el perro, existen diferencias anatómicas e histológicas entre unas y otras especies^{29,30}. Por ello se hace necesario extender su uso en las especies animales mantenidas como mascotas, como, por ejemplo, la iguana verde o común (*Iguana iguana*)³¹, que se ha convertido en una mascota muy popular en distintos países en los últimos años.

La bibliografía existente en relación con la evaluación de la visión mediante electroretinografía en reptiles es escasa^{2-5,32-34}, puesto que de manera tradicional se le ha prestado más atención en el campo de la electroretinografía a los pequeños animales¹; concretamente, solamente existe un estudio muy antiguo sobre electroretinografía en la iguana verde². Por tanto, es necesario realizar más investigaciones en el campo de la oftalmología clínica en esta especie.

Por todo ello, en este estudio se han planteado los siguientes objetivos:

- Estandarizar un protocolo de examen electroretinográfico en la iguana verde (*Iguana iguana*) para obtener ERGs normales en iguanas verdes (*Iguana iguana*) sanas en condiciones tanto fotópicas como escotópicas, y así poder determinar los fotorreceptores existentes en la retina.
- Evaluar la influencia de las variables biométricas peso y longitud narina-cloaca (LNC) en los distintos parámetros electroretinográficos.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. Principales datos biológicos de la *Iguana iguana*

La iguana verde se clasifica a nivel taxonómico de la siguiente manera:

- Reino: Animal.
- Filo: Cordados.
- Clase: Reptiles.
- Orden: Escamosos.
- Familia: Iguánidos.
- Género: *Iguana*.
- Especie: *iguana*³¹.

La iguana verde es un reptil de hábitos diurnos que vive en una gran variedad de hábitats. Se encuentra por los bosques húmedos tropicales de Centroamérica, y se extiende hasta el norte de Sudamérica. Puede trepar por los troncos y ramas con gran rapidez y vive sobre todo en árboles y arbustos que crecen en las proximidades de ríos y pantanos. Los jóvenes se alimentan sobre todo de insectos, mientras que los adultos son fundamentalmente folívoros. Su comportamiento defensivo se basa, fundamentalmente, en el uso de su potente cola, aunque, por lo general, prefieren la huida; en estos casos se suelen tirar al agua, ya que son ágiles nadadores³¹.

La cabeza está recubierta de escamas grandes y lisas; la garganta está dotada de un saco colgante estrecho –más desarrollado en los machos– rodeado de una fila de grandes tubérculos puntiagudos. La línea vertebral del tronco está atravesada por una cresta de largos tubérculos espinosos que van de la nuca a la cola. La coloración de las partes superiores es verde brillante o verduzca con algunas franjas transversales oscuras en los flancos y cola. La longitud total varía entre 100 a 200 cm³¹.

2. El órgano de la visión

Desde un punto de vista físico el ojo es esencialmente una cámara oscura provista de medios dióptricos:

- Córnea.
- Humor acuoso.
- Cristalino.

-Cuerpo vítreo.

La superficie interna de esta cámara oscura está revestida por la retina³⁵ en la cual se pueden distinguir dos sistemas a nivel funcional. En primer lugar un sistema fotópico, ligado al funcionamiento de los conos, que es el soporte de la visión de los detalles y de los colores, y en segundo lugar un sistema escotópico, ligado al funcionamiento de los bastones, siendo éste el soporte de la visión nocturna³⁶.

Los rayos de luz que proceden de cada punto de un objeto iluminado llegan a la córnea, donde son refractados, y convergen sobre el cristalino³⁵. En el cristalino los rayos son refractados sobre la capa fotosensible de la retina³⁵. Una vez que alcanzan la retina comienzan a generarse los potenciales de acción desde las regiones distales de la retina, donde se localizan los fotorreceptores, hacia las regiones proximales, donde se localizan los somas y los segmentos iniciales de los axones de las células ganglionares para continuar a lo largo de las fibras ópticas hacia el cerebro³⁷. En relación al objeto, la imagen retiniana está invertida y es mucho más pequeña de tamaño³⁵.

3. Estructura y funcionamiento de la retina

En mamíferos la retina es la capa más interna del globo ocular. En su parte externa contacta con la superficie interna de la coroides, y en su parte interna contacta con el vítreo. Se extiende desde la papila del nervio óptico hasta la *ora serrata*. La retina está firmemente fijada en la papila, donde se continúa con el tejido del nervio, y en la *ora serrata*, donde está fuertemente fijada a la coroides. Si dejamos a un lado la fovea, la papila y la *ora serrata*, en la retina podemos distinguir las siguientes capas histológicas (Figura 1) que se

disponen en el ojo paralelamente desde el interior hacia el exterior³⁵:

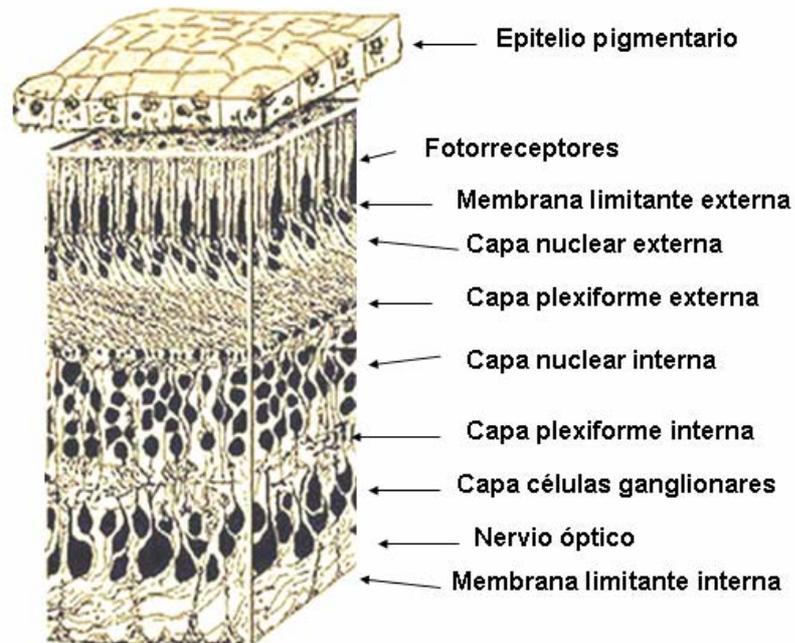


Figura 1. Capas de la retina³⁵.

- Epitelio pigmentario.
- Capa de células fotorreceptoras.
- Membrana limitante externa.
- Capa nuclear externa.
- Capa plexiforme externa.
- Capa nuclear interna.
- Capa plexiforme interna.
- Capa de las células ganglionares.
- Capa de las fibras del nervio óptico.
- Membrana limitante interna.

Estas capas histológicas están constituidas por tres tipos básicos de células³⁸:

- Células del epitelio pigmentario.
- Células de sostén o células de Müller.
- Neuronas:
 - Células fotorreceptoras.
 - Células integradoras³⁵:
 - Células horizontales.
 - Células bipolares.
 - Células amacrinas.
 - Células interplexiformes.
- Células ganglionares.

Las capas histológicas y las células de los mamíferos coinciden en los reptiles -a excepción de las células interplexiformes, que no se han observado en los reptiles-³⁰.

3.1. El epitelio pigmentario y las funciones que desempeña

El epitelio pigmentario es, en los mamíferos, una interfase entre la retina sensorial y la coroides. La parte basal de estas células descansa sobre la membrana de Bruch³⁶, que está constituida por fibras elásticas³⁹. La porción apical de la célula mira hacia los conos y bastones y de ella parten dos tipos de prolongaciones³⁵:

- a. Láminas cilíndricas que rodean la punta de los segmentos externos de los fotorreceptores.
- b. Microvellosidades que ocupan los intersticios que hay entre los fotorreceptores.

Esta parte apical constituye el límite distal del espacio sub-retiniano³⁶.

Las características generales del epitelio pigmentario de los reptiles coinciden con el descrito para los mamíferos^{30,40}.

Una de las funciones del epitelio pigmentario es la de ayudar a captar los fotones luminosos no absorbidos por los fotorreceptores gracias a sus pigmentos de melanina⁴¹. Otra función es la de transferir los elementos nutritivos hacia las células sensoriales⁴¹ (ej. almacenamiento y cesión de los metabolitos de la vitamina A, a través de la membrana apical en el curso de la regeneración de los pigmentos visuales)⁴². Además, el epitelio pigmentario ayuda a mantener la homeostasis en el espacio sub-retiniano⁴³ tanto a nivel de la membrana apical⁴⁴ como a nivel de la membrana basal⁴⁵. Esta homeostasis es esencial para mantener la cohesión entre el epitelio pigmentario y los fotorreceptores⁴⁶. El epitelio pigmentario también participa en la renovación de los segmentos externos de los fotorreceptores por fagocitosis. Esta función de catabolismo es bien conocida, pero los fenómenos de formación de nuevas membranas es menos conocido⁴¹.

3.2. Las células fotorreceptoras

En mamíferos existen dos tipos de células fotorreceptoras³⁵: conos y bastones.

Sus segmentos externos son las partes sensibles a la luz, de manera que los rayos luminosos deben atravesar la mayor parte del espesor de la retina antes de alcanzar tales segmentos, y estructuralmente son diferentes. Sus segmentos internos, sin embargo, son parecidos a nivel estructural³⁵.

a) Células de los conos

Estas neuronas tienen prácticamente la misma constitución que las células de los bastones, aunque difieren en algunos detalles. No hay rodopsina en los conos, sino que en lugar de ella hay diferentes tipos de pigmentos sensibles a diferentes longitudes de onda (azul con longitud de onda de 419 nm, verde de 531 nm y rojo de 558 nm). En vez de ser un cilindro delgado, el segmento externo de los conos es una estructura cónica alargada,

considerablemente más ancha en su base que un bastón, que se adelgaza hacia el extremo vitreal y que termina de forma redondeada y roma³⁵.

La longitud de los conos varía de unas regiones a otras de la retina. Tienen mayor longitud en la fóvea central disminuyendo progresivamente conforme se alejan de ella³⁵.

A diferencia de lo que ocurre con los bastones, la renovación de los segmentos externos de los conos no implica ni el movimiento continuo de los discos hacia el epitelio pigmentario ni la fagocitosis de sus extremos por las células del epitelio pigmentario³⁵.

Los cuerpos y los núcleos de los conos, a diferencia de lo que ocurre con los bastones, están dispuestos en una capa única, por debajo de la membrana limitante externa. Una excepción a este detalle la constituyen los conos de la parte externa de la fóvea, cuyos núcleos se disponen en varias hileras³⁵.

Una fibra interna lisa desciende del cuerpo hasta la zona media de la capa plexiforme externa, donde termina con un extremo sináptico grueso, triangular o en forma de maza, denominado pedículo del cono. Hasta una docena de prolongaciones en forma de púa sobresalen de la base de cada pedículo, excepto en la fóvea, donde de ordinario no hay ninguna. Estas prolongaciones están desplegadas horizontalmente en la capa plexiforme externa. La longitud y el trayecto de las fibras internas de los conos pueden variar considerablemente, según las regiones. Las más largas (600 μm), y dispuestas casi horizontalmente, son las del área central, donde las fibras internas de los conos y bastones forman una gruesa capa fibrilar entre las capas nuclear externa y plexiforme externa, llamada la capa fibrosa externa de Henle. Las fibras internas de los conos tienen todas las características de un axón, mientras que el pedículo de los conos tiene la característica de una terminación sináptica neuronal³⁵.

En los reptiles encontramos diferentes tipos de células fotorreceptoras que varían según el género. Aunque en la bibliografía consultada no se encuentran descritas las células fotorreceptoras de todos los géneros

existentes, a nivel general los diferentes tipos de células fotorreceptoras tienen en común la siguiente ultraestructura³⁰:

- Segmento exterior: constituido por pilas de retículo endoplasmático y que se encuentra anclado en una invaginación del segmento interior mediante un pedículo estrecho situado excéntricamente y que tiene la estructura de un cilio.

- Segmento interior; en el cual encontramos:

- Gota de aceite: no tiene membrana propia y se encuentra libre en la periferia del elipsoide. Se piensa que actúa como filtro de color intraocular y absorbe el espectro azul de la luz, que es el más susceptible de dispersarse dentro del ojo y de reducir el contraste de la imagen.

- Elipsoide: contiene una gran cantidad de mitocondrias empaquetadas.

- Mioide: donde encontramos un aparato de Golgi y el paraboloides. El paraboloides es un cuerpo refringente.

- Núcleo.

- Axón.

En los géneros *Eremias*⁴⁷ y *Alligator*⁴⁸ se han descrito cambios fotomecánicos de las células fotorreceptoras; cambios que comprenden la contracción de los conos y la expansión de los bastones en condiciones fotópicas y viceversa.

En los géneros *Lacerta*⁴⁹, *Xantusia*, *Lialis* y *Anolis*³⁰ encontramos tres tipos de fotorreceptores:

- Conos individuales mayores.

- Conos individuales menores.

- Conos dobles: son la asociación de dos células de distinta forma y tamaño cuyas membranas mantienen un contacto estrecho. La célula axial es más voluminosa, en contraposición a la célula periférica, que es más delgada³⁰.

Como ejemplo, diremos que en la parte nasal de la retina del género *Anolis* las proporciones son las siguientes³⁰:

- Conos individuales mayores: 57%.
- Conos individuales menores: 14%.
- Conos dobles: 29%.

En general, en los saurios de hábitos diurnos, en el género *Heloderma*, de hábitos nocturnos, y en el género *Anniella*, de hábito fosorial –que pasa la mayor parte de su actividad vital bajo tierra- se ha observado que la retina se compone solamente de conos: conos individuales mayores y conos dobles. Los conos individuales menores se han descrito en los géneros *Crotaphytus*, *Phrynosoma*, *Agama*, *Chamaeleo* y *Ameiva*. En los gekónidos (familias Gekkonidae, Pygopodidae y Dibamidae), que suelen tener hábitos nocturnos o crepusculares, encontramos conos individuales mayores, conos dobles y un tercer tipo específico de los gekónidos, que en realidad es un segundo tipo de cono doble⁵⁰ que consiste en la asociación de dos células: una que se corresponde con la estructura de un cono individual mayor, y otra que se corresponde con la estructura de un cono individual menor. Estos conos descritos en los gekónidos tienen la peculiaridad de funcionar como bastones, es decir, en condiciones escotópicas⁵¹.

En contraposición a lo que sucede en los saurios, en los ofidios está descrita la existencia de bastones. Por ejemplo, en los ofidios pertenecientes a la superfamilia Henophidia es frecuente encontrar una retina compuesta por conos y bastones³⁰. En la superfamilia Typhlopoidea los géneros estudiados tienen su retina compuesta solamente por bastones individuales menores. Por otro lado, en la superfamilia Caenophidia, se describen cuatro tipos distintos de fotorreceptores: conos individuales menores y mayores, conos dobles y bastones individuales menores⁵². Tanto en la superfamilia Henophidia como en la Caenophidia los géneros de hábitos predominantemente diurnos tienen una retina compuesta sólo por conos, de igual manera que en los géneros de hábitos nocturnos el cociente de conos/bastones disminuye considerablemente hasta el punto de que en algunas especies desaparecen los conos³⁰.

En los quelonios podemos encontrar una retina con conos individuales mayores, conos dobles y bastones⁵³, y en el género *Chelydra* también encontramos conos individuales menores³⁰.

Al igual que en los quelonios, en los crocodilianos existen conos individuales mayores y menores, conos dobles y bastones, pero en los crocodilianos los bastones son el tipo de fotorreceptor más numeroso³⁰.

b) Células de los bastones

Los bastones son células alargadas, delgadas y muy especializadas, que se disponen paralelamente entre sí y cuyas porciones externas son perpendiculares a las capas de la retina. El segmento externo, recto y cilíndrico, se extiende desde el epitelio pigmentario, hasta la denominada membrana limitante externa. Además tal y como hemos señalado anteriormente, sus puntas se exfolian de forma continua y son fagocitadas por las células del epitelio pigmentario³⁵.

Desde el cuerpo celular la fibra interna se extiende a través de la capa nuclear externa hasta alcanzar la capa plexiforme externa, en la que finaliza mediante una estructura piriforme denominada esférula del bastón, que representa la zona del contacto sináptico entre la fibra interna del bastón y las prolongaciones de las células bipolares y horizontales³⁵.

En el segmento externo encontramos el pigmento visual de los bastones que se denomina rodopsina. Este pigmento se encuentra localizado en las membranas de centenares de sacos planos dispuestos en forma de laminillas paralelas orientadas transversalmente respecto al eje longitudinal del segmento externo. Este segmento externo se une al segmento interno mediante un estrecho tallo. La porción externa del segmento interno se denomina habitualmente elipsoide, y la interna, mioide³⁵.

En el cuerpo celular, el núcleo de los bastones es de menor tamaño que el de los conos y su cromatina se encuentra más condensada. Los núcleos de los bastones constituyen la mayor parte de los que se observan en la capa nuclear externa de la retina en todas las regiones de ésta, excepto en la fóvea, en la que son escasos los bastones (ausentes en la parte central de la fóvea).

En la capa plexiforme externa, las fibras internas de los bastones, adoptan una orientación inclinada u horizontal en la región central de la retina, pero en las regiones más periféricas se disponen verticalmente. Los bastones presentan también algunas variaciones regionales en sus dimensiones³⁵.

3.3. La transducción visual en los fotorreceptores

La transducción visual engloba el conjunto de acontecimientos que van desde la detección puramente física de un fotón hasta la génesis de una señal electrofisiológica⁵⁴. El proceso de transducción tiene dos fases³⁵:

-La fase primaria es una reacción fotoquímica que consiste en la absorción de un cuanto de luz por uno de los pigmentos visuales contenidos en los discos de los segmentos externos de las células fotorreceptoras, y el subsiguiente cambio de configuración que sufre la molécula absorbente.

-La fase secundaria consiste en los cambios en la concentración de transmisores internos dentro del citoplasma de los segmentos externos que influyen sobre la permeabilidad iónica de la membrana citoplasmática. El cambio de permeabilidad causa la hiperpolarización de la célula fotorreceptora que desencadena los procesos electrofisiológicos.

El encadenamiento de las etapas, puramente bioquímicas, de la transducción visual de los bastones, está hoy en día bien descrito, mientras que todavía no está bien definido el de los conos⁵⁴.

El bastón es una célula extremadamente diferenciada; a menudo se le compara con un detector de fotones de gran sensibilidad ya que un sólo fotón puede estimular un bastón. La zona donde se inicia en su totalidad el mecanismo de la transducción visual es el segmento externo, mientras que el segmento interno encierra la maquinaria metabólica y genética⁵⁴.

a) Fase primaria: Los procesos fotoquímicos en los bastones

Cualquiera que sea la longitud de onda de los fotones que inciden sobre un receptor, su detección implica necesariamente su absorción. En el bastón, la absorción de un fotón se realiza gracias a una molécula fotosensible: la rodopsina. La rodopsina está constituida por una proteína, la opsina, ligada a

un conjunto cromóforo, el 11-cis retinal. Esta unión de la opsina con el 11-cis retinal permite que los fotones de longitud de onda de 500 nm sean absorbidos de manera preferente y es el factor responsable de la mayor sensibilidad de la retina a longitudes de onda de 500 nm (espectro azul-verde) en condiciones escotópicas⁵⁴.

Cuando la molécula de rodopsina absorbe un fotón, se produce una isomerización de su conjunto cromóforo y el retinal de la forma 11-cis pasa a la forma todo-trans; al final del ciclo la opsina se separa del cromóforo. El ciclo de regeneración del pigmento visual se realiza fundamentalmente en la oscuridad. La forma todo-trans retinal se une a una isomerasa para volver a la molécula de 11-cis retinal. La asociación opsina/retinal es termodinámicamente espontánea, es decir, la opsina tiende una “trampa” al 11-cis retinal para volver a constituir la rodopsina⁵⁴.

b) Fase secundaria: Los procesos bioquímicos en los bastones

En la oscuridad existe un equilibrio iónico que es modificado cuando la célula pasa de la oscuridad a la luz. Esta modificación consiste en una “cascada bioquímica” que se divide en tres fases⁵⁴:

a. Ciclo de la rodopsina. Cuando la rodopsina se activa por un fotón, el cromóforo de la molécula de rodopsina se transforma en todo-trans retinal que va a interactuar con la transducina (molécula compuesta de tres subunidades: α , β , γ , de las que la subunidad α está ligada al GPD).

b. Ciclo de la fosfodiesterasa (PDE). La transducina activada va a separarse en dos y la fracción α va a intercambiar su GPD por un GPT. Este intercambio provocará una ruptura de la molécula que conducirá a la liberación de la fracción α -GPT. La fracción α -GPT va a impedir la inhibición de la PDE. Por lo tanto la PDE estará activada.

c. Ciclo del GMPc. La PDE activada va a hidrolizar las moléculas del GMPc en 5'-GMPc. La disminución de GMPc citosólico provocará el cierre de los canales del sodio de la membrana del segmento externo.

El conjunto de estos acontecimientos dura alrededor de 100 ms y un fotón activa una molécula de rodopsina que puede activar 100 moléculas de

transducina, que, a su vez, activarán 100 PDE responsables de la hidrólisis de 10^5 GMPc lo que provoca el cierre de 10^3 canales de sodio^{55,56}.

Los mecanismos de desactivación actúan igualmente sobre las tres fases de transducción. La rodopsina es fosfoligada e inactivada completamente por una proteína: la arrestina. La transducina tiene la propiedad de autoinactivarse; la fracción α -GPT tiene la propiedad de hidrolizar la GPT fijada en GPD (con una cinética que permite la liberación de la PDE); la fracción α -GPT se transforma en fracción α -GDP para volver a formar con las fracciones β y γ una molécula de transducina. El GMPc se puede volver a formar a partir de GPT gracias a una ciclasa. Existe un equilibrio entre el GMPc reconstituido -que mantiene los canales del sodio abiertos- y el GMPc en solución. La evolución de este equilibrio condiciona la apertura/cierre de dichos canales^{57,58}. El papel de los iones calcio es primordial en la regulación de este equilibrio⁵⁹.

En la célula fotorreceptora, este fenómeno de adaptación a la luz se traduce en términos de amplitud y de cinética de la fotorrespuesta. La fotocorriente registrada en el ámbito de un bastón muestra que su intensidad es máxima en la oscuridad, que desciende regularmente cuando el nivel de luminosidad ambiente aumenta y que su duración es más corta cuando la célula está adaptada a la luz. El fotorreceptor regula su nivel de sensibilidad en función de la luz ambiente. Los quelantes de los iones calcio bloquean estos fenómenos de modulación de la foto respuesta^{60,61}.

La vuelta a la oscuridad destruye enormemente este equilibrio. En la oscuridad, los bastones son particularmente sensibles a los fotones luminosos y en ambiente fotópico conservan una parte de la sensibilidad a la luz gracias a un equilibrio modulado por los iones calcio⁵⁴.

c) Los procesos electrofisiológicos en los bastones

En la oscuridad, la membrana plasmática del segmento externo del bastón se despolariza y un flujo de iones sodio penetra en el segmento externo y sale por el interno. Este flujo de iones sodio es el origen de la corriente de oscuridad (dark current). Cuando una célula es excitada, la medida de estos flujos iónicos muestra la disminución de la intensidad de esta fotocorriente⁶² y provoca una hiperpolarización de la célula. Este fenómeno es importante

puesto que, en la mayor parte de los casos, las células excitadas del organismo responden a la estimulación por una despolarización de membrana ligada a un aumento de la permeabilidad a los iones sodio. En el caso del fotorreceptor, la respuesta a la estimulación por un fotón es una hiperpolarización ligada a la disminución (cierre de los canales del sodio). Esta hiperpolarización de membrana constituye la primera respuesta electro-iónica de la célula a la excitación luminosa. Ello empieza en el segmento externo, luego se transmite a lo largo del bastón y constituye el potencial del receptor⁶³⁻⁶⁶.

3.4. La etapa de transmisión

La imagen ocular es “muestreada” por más de 100 millones de células fotorreceptoras (alrededor de 95 millones de bastones y 5 millones de conos en la retina humana)^{67,68} y todo su contenido en información debe ser tratado y colocado en un formato neuronalmente adecuado para poder activar un poco más de un millón de células ganglionares. La retina tiene que compactar la imagen ocular³⁷. En la etapa de transmisión participan todas las células de la retina³⁶.

Los bastones pueden generar una fotocorriente detectable cuando un fotón es absorbido por una molécula del pigmento visual. Como el diámetro del segmento externo es de un tamaño muy pequeño, los bastones muestrean finamente la imagen; sin embargo, hay un gran número de bastones que convergen sobre los mismos elementos postsinápticos. Así pues, la visión escotópica, a pesar de su gran sensibilidad, es incapaz de discriminar espacialmente detalles finos. Por el contrario, las señales generadas por los conos centrales, lejos de converger en una sola neurona, divergen en varias, confiriendo a los conos una visión espacial muy detallada⁶⁹. En los primates, según la sensibilidad espectral del pigmento fotosensible⁷⁰ y de las medidas de absorción espectral⁷¹, se distinguen tres tipos de conos:

-Conos con un máximo de absorción en las longitudes de onda de 419 nm o conos tipo S^{70,71}.

-Conos con un máximo de absorción en las longitudes de onda de 531 nm o conos tipo M^{70,71}.

-Conos con un máximo de absorción en las longitudes de onda de 558 nm o conos tipo L^{70,71}.

El número relativo y la distribución de los bastones y los conos en los diferentes vertebrados presentan grandes variaciones, que dependen de sus diferentes hábitos de vida. En las aves diurnas, los conos son más numerosos que los bastones. En la mayoría de los reptiles diurnos los bastones son muy raros. En muchos vertebrados nocturnos, sólo hay bastones, aunque en otros pueden encontrarse algunos conos rudimentarios entre los numerosísimos bastones. En estudios psicofísicos recientes realizados en humana se ha observado que el número de conos rojos dobla al de los verdes³⁵.

En general las especies de mamíferos nocturnos presentan un número mayor de bastones y una cantidad proporcionalmente menor de los conos, sin embargo, las especies de hábitos diurnos muestran retinas especialmente profusas en el número de conos³⁵.

Respecto a la electrofisiología de los fotorreceptores no podemos olvidar que la despolarización de las terminaciones sinápticas es un acontecimiento electro-iónico indispensable para desencadenar los mecanismos de liberación de los neuromedadores, no pasa inadvertido que en la oscuridad, cuando la membrana plasmática está despolarizada, el fotorreceptor libera continuamente su neurotransmisor (glutamato)⁷², único neurotransmisor utilizado por los fotorreceptores en cada una de sus sinapsis en los primates⁷³. El haz de luz produce una hiperpolarización de los fotorreceptores por disminución de la corriente de oscuridad. La amplitud de esta hiperpolarización varía en función del contenido energético del estímulo luminoso (función sigmoideal); esta variación del potencial de membrana reduce proporcionalmente la tasa de liberación del neurotransmisor. Las células postsinápticas (células horizontales y bipolares) reciben de esta manera una información cuantitativa sobre la intensidad de la luz que llega al segmento externo del fotorreceptor³⁷.

Existe una gran diferencia de sensibilidad entre los conos y los bastones. Los bastones son 100 veces más sensibles a la luz que los conos, y sus respuestas a los estímulos luminosos duran más que las de los conos³⁷.

Los fotorreceptores tienen unas respuestas proporcionales a la cantidad de luz que les llega, en un tiempo determinado, en su segmento externo y que se traduce en unas actividades sinápticas adecuadas. Sin embargo, los fotorreceptores no son independientes los unos de los otros. Existen unas sinapsis eléctricas (*gap-junctions*) entre terminaciones de los conos y entre conos y bastones. Estas uniones tipo *gap* son unos canales iónicos que permiten un paso rápido de iones y de pequeñas moléculas de una parte a otra del punto de contacto. Las *gap-junctions* pueden funcionar en los dos sentidos. Así pues, la amplitud de la respuesta de una célula fotorreceptora aumenta cuando los fotorreceptores vecinos son iluminados. Esta “suma espacial” se circunscribe a una superficie de 50 a 100 μm . Las uniones sinápticas de los fotorreceptores con las células subyacentes se realizan en la capa plexiforme externa, donde se encuentran los “pies” de los fotorreceptores, denominados *esférulos* en el caso de los bastones y *pedículos* en el caso de los conos³⁷.

La membrana presináptica del fotorreceptor tiene una forma compleja característica: la *triada* (sinapsis en cinta). El elemento central de la *triada* está compuesto por una dendrita de célula bipolar, y los dos elementos laterales, por las dendritas de las células horizontales. La sinapsis invaginada de naturaleza química permite una transmisión unidireccional del influjo nervioso después de un tiempo de latencia³⁷. Los conos tienen una veintena de sinapsis en cinta de este tipo⁷⁴, las cuales aumentan en la periferia⁷⁵, mientras que los bastones sólo tienen una sinapsis. En este tipo de sinapsis invaginada llegan de dos a siete arborizaciones dendríticas de células bipolares a los bastones, acompañadas de terminaciones axónicas de células horizontales. En los conos, en el perímetro de las sinapsis invaginadas existen igualmente sinapsis superficiales (más numerosas que las sinapsis invaginadas) que establecen contacto con las células bipolares planas³⁷.

3.5. La membrana limitante externa

La línea densamente teñida que tradicionalmente se ha llamado membrana limitante externa no es, en absoluto, una membrana³⁵. En mamíferos es en realidad, tal como se observa en microscopía electrónica, una hilera de zónulas adherentes donde las células fotorreceptoras están unidas a

las células de Müller. Por el exterior de esta hilera de zónulas adherentes, hay penachos de microvellosidades que se proyectan en la superficie libre de las células de Müller a través de los intersticios que existen entre los segmentos internos de conos y bastones³⁵.

En reptiles la membrana limitante externa está formada por uniones de tipo zónulas adherentes entre las células fotorreceptoras y las células de Müller que se disponen entre cada célula fotorreceptora. En la parte escleral de la membrana limitante externa, las células de Müller dan pequeñas evaginaciones, que contienen vacuolas, entre los pliegues -en forma de aletas- de los conos individuales³⁰.

3.6. La capa nuclear externa

En mamíferos la capa nuclear externa contiene los cuerpos celulares de las células fotorreceptoras³⁸.

En la especie *Lacerta viridis*, un saurio de hábitos diurnos, podemos encontrar tres niveles⁷⁶. El nivel externo contiene los núcleos de los conos, que se disponen en el mismo sentido que sus axones, y las células bipolares grandes. En el nivel medio se encuentran los núcleos de los conos dispuestos oblicuamente a sus axones, los cuales terminan en el nivel interno de la capa plexiforme externa. No está determinada la correspondencia de estas dos disposiciones de los conos con respecto a los dos tipos de conos individuales. El nivel interno tiene los núcleos de las células bipolares desplazadas⁷⁶.

Estas células bipolares desplazadas las podemos encontrar en los siguientes géneros pertenecientes al suborden Sauria: *Lacerta*, *Varanus*, *Psammmodromus*, *Anguis*, *Gerrhonotus*, *Pseudopus* y *Anniella*. Sin embargo los ofidios y los géneros del suborden Sauria *Crotaphytus*, *Agama*, *Chamaleo*, *Phrynosoma* y *Ameiva* carecen de estas células³⁰. Todos los axones de las células fotorreceptoras terminan en complejos polisinápticos^{77,30} que contactan en gran número -hasta varios cientos- con células bipolares y también, aunque en menor cuantía, con células horizontales³⁰.

3.7. Las células horizontales

En mamíferos estas células son neuronas típicas cuyos cuerpos forman una o dos hileras. Del extremo del cuerpo que mira a la esclerótica nacen unas ramas dendríticas cortas, que producen varios penachos desplegados por la capa plexiforme externa. Cada penacho dendrítico está conectado con el pedículo de un cono³⁵. Según el destino de su axón, se pueden distinguir en la retina humana tres tipos de células horizontales⁷⁸:

-Células horizontales tipo H1.

-Células horizontales tipo H2.

-Células horizontales tipo H3.

En el gato y en el conejo, las células horizontales -que son homólogas a las células horizontales tipo H2 del ser humano- no presentan axón³⁵.

En el género *Lacerta* encontramos dos tipos de células horizontales que ocupan la zona externa de la capa nuclear interna⁷⁶:

-Células horizontales tipo en cepillo.

-Células horizontales tipo estrella.

Las células horizontales tipo en cepillo poseen una arborización dendrítica muy densa y actúan en un área limitada, mientras que las de tipo estrella tienen dendritas mucho más largas y actúan sobre un área mucho mayor.

Los cuerpos neuronales de las células horizontales son más grandes que los de las células bipolares, y, además, su citoplasma contiene unas pocas mitocondrias y aparatos de Golgi. Tienen unas evaginaciones de grandes dimensiones que se distribuyen en la zona interna de la capa plexiforme externa y sus ramificaciones hacen sinapsis radialmente con las células fotorreceptoras⁷⁶.

Desde el punto de vista electrofisiológico encontramos lo siguiente:

-las células horizontales tipo H1 tienen unos campos dendríticos de pequeño tamaño, pero un árbol dendrítico más importante en la periferia que puede contactar con 18 conos. Las células H1 reciben las señales pre

sinápticas exclusivamente de los conos M y L. Estas células se conectan también con las células horizontales y, a través de las células bipolares, a los bastones. Su único axón se extiende lateralmente para ir a terminar en las partes laterales de las sinapsis en cinta de los conos M y L y de los bastones³⁷.

-las células horizontales tipo H2 contactan con los conos S y el contacto se produce alrededor de los conos S y de algunos conos M y L⁷⁹.

-las células horizontales tipo H3 poseen una arborización evitando los conos S⁸⁰.

Las células horizontales tipo H1 y H2 son muy probablemente gabérgicas; ahora bien, en numerosas especies la liberación del neurotransmisor GABA se realiza según un mecanismo independiente de los iones calcio⁸¹.

Las células horizontales participan también en la generación del “perímetro” del campo receptor –concepto que se describirá más adelante– jugando un papel de interneurona. Este papel lo desempeña permitiendo a una célula bipolar dada recoger las respuestas de numerosos fotorreceptores distribuidos sobre la superficie retiniana y situados hacia fuera y más allá de la zona de contactos sinápticos directos de los fotorreceptores por la arborización dendrítica de la célula bipolar en cuestión. En efecto, en numerosas especies, las células horizontales homólogas están eléctricamente emparejadas^{82,83}, lo que tiene como fin aumentar el perímetro del campo receptor de la célula bipolar. Este emparejamiento puede ser modificado por un neurotransmisor. La dopamina reduce en gran medida este emparejamiento^{84,85}; ahora bien, la fuente de dopamina se sitúa en una clase de células amacrinas dopaminérgicas que se encuentran en la capa plexiforme interna. La capa plexiforme interna tiene la posibilidad de enviar una señal retroactiva hacia la capa plexiforme externa. Las antagonistas del GABA aumentan la liberación de dopamina; además, en condiciones de adaptación de luz, las células dopaminérgicas van a ser tónicamente inhibidas por las células amacrinas gabérgicas^{85,86}.

3.8. Las células bipolares

En mamíferos se han descrito dos grandes clases de células bipolares³⁷:

-Células bipolares de los conos.

-Células bipolares de los bastones.

Desde el punto de vista de la conexión con el tipo de cono se clasifican en tres tipos³⁷: M, L y S.

Desde el punto de vista de su arborización, las células bipolares de los conos se dividen, a su vez, en dos grandes grupos³⁷:

-Células bipolares de los conos difusas. En el hombre existen cinco categorías.

-Células bipolares de los conos enanas. En el hombre encontramos tres categorías.

A su vez, y, desde el punto de vista de su conexión sináptica, las células bipolares de los conos (enanas y difusas) se dividen en dos grupos:

-Células bipolares de los conos invaginadas³⁵, cuyas terminaciones axónicas se realizan en la sub-capa b de la capa plexiforme interna³⁷.

-Células bipolares de los conos planas³⁵, cuyas terminaciones axónicas se realizan en la sub-capa a de la capa plexiforme interna³⁷.

Así mismo, en reptiles se han hecho estudios en el género *Lacerta* en el que se distinguen dos tipos principales de células bipolares en su retina⁷⁶:

-Células bipolares pequeñas. Las células bipolares pequeñas son más numerosas y poseen evaginaciones ascendentes y descendentes. Las evaginaciones ascendentes envían fibras hacia la capa plexiforme externa; sin embargo las evaginaciones descendentes son más finas y siguen un curso oblicuo en la capa nuclear interna y terminan en la capa plexiforme.

-Células bipolares grandes. Las células bipolares grandes se encuentran en la zona externa de la capa nuclear externa con arborizaciones sinápticas que salen directamente del cuerpo celular. Las evaginaciones descendentes están parcialmente recubiertas por las células de Müller.

Desde el punto de vista electrofisiológico las células bipolares de los conos y de los bastones reciben las señales de entrada de los conos y los bastones para transferirlas, a nivel de la capa plexiforme interna, a las células amacrinas y a las células ganglionares³⁷.

Las células bipolares de los conos difusas recogen las señales convergentes de varios conos vecinos (mínimo cinco y siempre conos M o L)³⁷.

Las células bipolares de los conos enanas recogen señales de un número limitado de conos (uno siempre del tipo M o L en la retina central o de 2 a 3 en la retina periférica)³⁷.

Funcionalmente las células bipolares de los conos planas, que tienen contactos superficiales, y las células bipolares de los conos invaginadas funcionan en tándem. Un cono de la fóvea hace sinapsis con dos bipolares: con una célula bipolar de los conos invaginada por medio de la unión central de la sinapsis en cinta; y con una célula bipolar de los conos plana mediante una unión superficial en la región vecina de la sinapsis en cinta⁸².

A las células bipolares de los conos planas e invaginadas les corresponde una dicotomía funcional fundamental³⁶:

-Centro-ON. Las células bipolares de los conos funcionalmente centro-ON son despolarizadas cuando el estímulo es proyectado sobre una región de la retina que contiene unos fotorreceptores con los cuales estas células están unidas por uniones sinápticas invaginadas.

-Centro-OFF. Las células bipolares de los conos que funcionalmente son centro-OFF son hiperpolarizadas en las mismas condiciones de estimulación.

El origen de esta dicotomía ON/OFF reside en el tipo de unión sináptica que las células bipolares hacen con las terminaciones de los fotorreceptores. Así pues, la célula bipolar de los conos invaginada responde al estímulo luminoso por una despolarización (invirtiendo así el signo de la polarización presente en el fotorreceptor) que es punto de salida de la vía ON. La célula bipolar de los conos plana, que tiene unión superficial, responde ante el estímulo luminoso como lo hace un fotorreceptor, es decir, mediante una hiperpolarización que es punto de partida de la vía OFF³⁶.

La respuesta sináptica de despolarización (vía ON) proviene de la activación de receptores metabotrópicos del glutamato utilizando el GMPc como segundo mensajero⁸⁸. La respuesta sináptica de hiperpolarización (vía OFF) proviene de la activación de receptores ionotrópicos AMPA-kainato de glutamato⁸⁷.

Las células bipolares de los bastones sólo hacen sinapsis con los bastones y mediante una invaginación³⁷.

Para una célula bipolar, la arborización se realiza con una treintena de bastones en el centro y una cuarentena en la periferia. La dimensión del campo de sus arborizaciones dendríticas aumenta del centro a la periferia³⁷.

Los axones de las células bipolares terminan en las *sub-capas a* o *b*. Para cada *sub-capa*, las terminaciones axónicas de las células bipolares realizan sinapsis químicas, ya sea con las arborizaciones dendríticas de las células ganglionares y las expansiones de las amacrinas, ya sea con las expansiones de dos células amacrinas³⁷.

a) La noción de campo receptor

Las células bipolares se encuentra conectadas a los fotorreceptores directamente por sinapsis o indirectamente por medio de las células horizontales, cuyas dendritas ocupan unas posiciones laterales en el interior de las sinapsis en cinta de los fotorreceptores³⁷.

Las células bipolares recogen las actividades de dos poblaciones de fotorreceptores, aquellos con los cuales tienen uniones sinápticas directas, y aquellos con los cuales están en relación por medio de las células horizontales. El conjunto de los fotorreceptores funcionalmente ligado a una célula bipolar dada constituye su campo receptor. Los fotorreceptores ligados mediante sinapsis directas constituyen el centro del campo receptor, y los ligados indirectamente constituyen la periferia. Para las células bipolares, el tamaño y la forma del centro depende de la arborización; la periferia es un anillo circular. Centro y perímetro son antagonistas. Cuando la luz incide sobre los fotorreceptores situados en el centro, las células bipolares-OFF directamente ligadas a estos fotorreceptores serán hiperpolarizadas, y las células bipolares-ON serán despolarizadas. Cuando la periferia es iluminada, la respuesta es en

sentido opuesto: las células bipolares-ON serán hiperpolarizadas y las células-OFF serán despolarizadas. En otros términos, cuando la estimulación del centro polariza una célula bipolar en un sentido, la estimulación de la periferia polariza la misma célula bipolar en el sentido opuesto³⁷.

La noción ON/OFF se aplica al tipo de conexión sináptica: ON equivale a unión central y despolarización y OFF a unión superficial lateral e hiperpolarización. La noción centro/periferia se aplica a la noción del campo receptor, y se describirán unas células bipolares-ON y OFF centro, y unas células bipolares-ON y OFF periferia³⁷.

b) Síntesis funcional en las células bipolares

En la oscuridad, los fotorreceptores están en un estado de despolarización; estos liberan continuamente su neurotransmisor: el glutamato. Este glutamato despolariza, a través de receptores ionotrópicos, las células bipolares con uniones superficiales y laterales (bipolares planas), e hiperpolariza, por medio de receptores metabotrópicos, las células bipolares con uniones invaginadas y centrales (bipolares invaginadas). Cuando los fotorreceptores están en estado de despolarización (oscuridad), las células bipolares planas están en estado de despolarización y las células bipolares invaginadas están en estado de hiperpolarización. En el caso de un aumento de luminancia, la despolarización del fotorreceptor se reduce y provoca una reducción de la liberación del glutamato. Esta reducción de la liberación del glutamato tiene por objetivo reducir su efecto sináptico, es decir, disminuir simultáneamente la despolarización de las células bipolares planas –que responderán, por lo tanto, con una hiperpolarización- y disminuir la hiperpolarización de las células bipolares invaginadas –que responderán con una despolarización-³⁷.

Las células bipolares planas pasarán de un estado de despolarización a un estado de hiperpolarización, y las células bipolares invaginadas pasarán de un estado de hiperpolarización a un estado de despolarización. Las células bipolares invaginadas serán, por lo tanto, denominadas células bipolares-ON, puesto que se despolarizan por un incremento de luminancia³⁷.

Cuando el estímulo luminoso cesa, se provoca una disminución de luminancia y el fotorreceptor vuelve a despolarizarse, por lo que se produce liberación del glutamato restaurándose los efectos sinápticos³⁷.

El glutamato hiperpolariza las células bipolares invaginadas que estaban en un estado de despolarización y despolariza las células bipolares planas que estaban en un estado de hiperpolarización. Las células bipolares planas se denominan entonces células bipolares-OFF, ya que se despolarizan por una disminución de la luminancia³⁷.

La naturaleza de los receptores y de los canales de membrana post-sinápticos de las dendritas de las células bipolares son los factores determinantes del signo del potencial post=sináptico. Las células bipolares hiperpolarizantes son el punto de partida del canal OFF y las células bipolares despolarizantes son el punto de partida del canal ON. Estos dos tipos –ON y OFF-, solo existen ligados a los conos. En los bastones solo se da el tipo ON³⁷.

El potencial de las células horizontales varía en el mismo sentido que los fotorreceptores. Cuando un fotorreceptor es hiperpolarizado por la luz, las células horizontales con las que conecta también se hiperpolarizan. Sin embargo, las células horizontales forman una sinapsis que actúa sobre las estructuras sinápticas de los fotorreceptores vecinos. Tenemos una retroacción que va a cambiar el signo de la transmisión fotorreceptor-bipolar: una célula bipolar-ON será despolarizada cuando el estímulo luminoso incide sobre los fotorreceptores con los que contacta directamente, y será hiperpolarizada cuando el estímulo afecte a los fotorreceptores vecinos unidos indirectamente por las células horizontales. Esta célula bipolar será despolarizada por un incremento en el centro de su campo receptor e hiperpolarizada por un incremento de la periferia de su campo receptor. Si la luz está uniformemente distribuida entre el centro y la periferia, la despolarización central será contrarrestada por la hiperpolarización periférica, y, por lo tanto, la respuesta se anulará. Por el contrario, si un incremento de luminancia en la periferia la hiperpolariza, una disminución la despolariza; en consecuencia, la respuesta será tanto más despolarizante al incremento del centro de su campo receptor, y éste estará asociado, a su vez, con una disminución de la periferia de su campo receptor³⁷.

Esto quiere decir que las células bipolares son detectores de contrastes. La célula bipolar-ON será estimulada por un centro claro y un fondo –periferia-oscura (contraste positivo), mientras que la célula bipolar-OFF será estimulada por un centro oscuro y un fondo claro (contraste negativo). La detección de los contrastes se asegura, así, por el antagonismo centro/periferia de los campos receptores de las células bipolares³⁷.

3.9. La capa plexiforme externa

En mamíferos esta es la región de conexión sináptica entre células fotorreceptoras, bipolares y horizontales. Las terminaciones sinápticas de los conos o pedículos son grandes terminaciones piramidales que contienen vesículas sinápticas y mitocondrias, cuya base está aplanada en muchos puntos para acoger los extremos de las dendritas de las células horizontales y de las células bipolares enanas invaginadas. El resto de la superficie libre de la base del pedículo produce centenares de contactos superficiales o basales con las dendritas de las células bipolares enanas planas y de las células bipolares difusas de los conos. Con gran constancia y orden geométrico, cada una de las 12 a 25 invaginaciones sinápticas del pedículo de un cono contiene el extremo de dos dendritas de células horizontales y de una dendrita de una célula bipolar enana invaginada, formando lo que se denomina una triada. Las dendritas de las células horizontales pueden contener vesículas sinápticas, están profundamente insertadas y se sitúan a cada lado de una prominencia cuneiforme del pedículo, llamada cresta sináptica. La dendrita de una célula bipolar enana invaginada se sitúa en medio y, más superficialmente, está separada del extremo de la cresta por la fisura que se interpone entre las dendritas de las células horizontales vecinas³⁵.

La cresta sináptica está dividida en su mitad por una lámina densa o cinta sináptica, rodeada por un halo de vesículas sinápticas; la cinta se sitúa erecta sobre la punta de la cresta y queda separada de la membrana del pedículo por un cuerpo en forma de cubeta denominado densidad arciforme. La significación de la cinta sináptica no está aclarada, pero es probable que juegue algún papel en la captura de las vesículas sinápticas y en su aproximación a la membrana plasmática³⁵.

Los contactos superficiales y basales de los pedículos de los conos no muestran especializaciones de unión muy desarrolladas; la fisura sináptica está ligeramente ensanchada y las membranas vecinas del pedículo y de las dendritas bipolares están revestidas por una capa de material citoplasmático floculento³⁵.

Las esférulas de los bastones tienen una invaginación sináptica única y carecen de contactos basales. En su sinapsis invaginada se insertan profundamente dos terminaciones axónicas de las células horizontales que yacen a uno y otro lado de una cresta que contiene una cinta sináptica con vesículas. Los extremos -de una a cuatro dendritas- que pertenecen a las células bipolares de los bastones se sitúan en el centro y a menos profundidad. Las terminaciones axónicas de las células horizontales contienen frecuentemente vesículas sinápticas³⁵.

En los reptiles podemos encontrar en la zona externa de la capa plexiforme externa los axones de las células horizontales, y en su zona interna, los axones de las células fotorreceptoras situados oblicuamente a sus cuerpos celulares³⁰.

3.10. Las células amacrinas

En mamíferos estas neuronas tienen numerosas dendritas, pero carecen de axón. Su cuerpo yace en la porción de la capa nuclear interna próxima al vítreo (amacrinas desplazadas) y sus dendritas se extienden por la capa plexiforme interna.

Las células amacrinas difusas envían sus ramas dendríticas por todo el espesor de la capa plexiforme interna, mientras que las ramificaciones de las células amacrinas estratificadas se limitan a diferentes pisos de la capa plexiforme interna³⁵. En el hombre disponemos de, al menos, 25 tipos de células amacrinas^{89,90}. Estas células presentan una gran diversidad morfológica en sus uniones y en su bioquímica⁹¹.

Las células amacrinas en los reptiles ocupan la zona interna de la capa nuclear interna. Son células grandes, más grandes que las células bipolares³⁰. Las evaginaciones de las células amacrinas descienden hacia la capa

plexiforme interna y hacen sinapsis con las células bipolares. También se cree que se asocian con las terminaciones sinápticas de las células ganglionares formando diadas post-sinápticas que conectan con botones terminales de las células bipolares³⁰.

Desde el punto de vista electrofisiológico las más numerosas son las glicinérgicas y las gabérgicas, que tienen neurotransmisores inhibidores – glicina y GABA-. Existen también células amacrinas dopaminérgicas y colinérgicas.

Las células amacrinas dan una respuesta transitoria en el establecimiento y al final de una estimulación luminosa; así pues, al contrario de lo que ocurre en las células bipolares, las variaciones de polarización se mantienen durante todo el tiempo de estimulación⁹¹. Un papel de microcircuito “de retorno” será atribuido a ciertas células amacrinas capaces de interrumpir la acción excitable sostenida de las células bipolares sobre las células ganglionares, realizando una verdadera diferenciación temporal sobre la señal transmitida de las células bipolares a las células ganglionares⁹².

Estas células amacrinas gabérgicas contribuyen a los aspectos dinámicos de las interacciones entre el centro y la periferia de los campos receptores de las células ganglionares⁹¹. La dicotomía ON/OFF con dos tipos de células bipolares solo existe como tal en la vía de salida de los conos. Los bastones solo tienen un tipo de sinapsis: sinapsis invaginadas. Por lo tanto las células bipolares de los bastones son todas del tipo ON. Sin embargo, las células bipolares de los bastones no se unen directamente con las células ganglionares, sino que lo hacen por intermediación de las células amacrinas AII. Estas células amacrinas reciben sus señales de las células bipolares de los bastones, y establecen sinapsis eléctricas excitadoras con las células bipolares-ON y sinapsis químicas inhibitoras glicinérgicas con las células bipolares-OFF. De tal manera que una célula bipolar de los bastones contribuye a la excitación en la vía ON y, simultáneamente, a la inhibición en la vía OFF; de esta manera, se mantienen bien separadas las dos vías ON y OFF, a pesar del hecho de que todas las células bipolares de los bastones están únicamente despolarizadas cuando hay un incremento de luz. Estas células AII son un ejemplo de células biestratificadas. En la sub-cap a están

en contacto con las células bipolares de los bastones y las células bipolares de los conos invaginadas (son células bipolares tipo ON), todas ellas unidas a células ganglionares ON. En la sub-capa a, las células AII están en contacto con las células bipolares de los conos planas (bipolares tipo OFF) y unidas ambas a las ganglionares OFF. Estas uniones juegan un papel fundamental en la recogida de la información de salida de los bastones⁹³.

3.11. Las células interplexiformes

En mamíferos las células interplexiformes tienen su pericarion en la capa nuclear interna y envían sus prolongaciones a ambas capas plexiformes. En la capa plexiforme interna, sus prolongaciones son a la vez pre y postsinápticas para las dendritas de las células amacrinas³⁵. Como ya hemos comentado, este tipo celular no se encuentra en reptiles³⁰.

Desde el punto de vista electrofisiológico estas células hacen de vínculo entre la capa plexiforme interna y la capa plexiforme externa. En el gato son gabérgicas, y en otras especies son dopaminérgicas, excepto en el hombre. Las células interplexiformes forman sinapsis con las células bipolares, las células amacrinas, las células ganglionares y con otras células interplexiformes³⁷.

3.12. Las células ganglionares

Las células ganglionares representan en mamíferos el enlace terminal de las redes neurales de la retina. Con sus dendritas, conectan con las terminaciones de las células bipolares y con las dendritas de las amacrinas de la capa plexiforme interna; sus cuerpos están localizados en el estrato de células ganglionares; sus axones, que se convierten en fibras del nervio óptico, transmiten al cerebro el resultado de la compleja actividad neuronal que tiene lugar en la retina³⁵. En el hombre, las células ganglionares constituyen una clase bien definida de neuronas (alrededor de un millón donde más de la mitad se sitúan en la zona central) de una gran diversidad morfológica⁶⁷.

En el gato encontramos tres categorías en función de su campo dendrítico:

- Células ganglionares α : células de gran tamaño y un campo dendrítico amplio.

- Células ganglionares β : células de pequeño tamaño y un campo dendrítico restringido⁹⁴.

- Un grupo morfológicamente heterogéneo: γ , δ y ϵ ⁹⁵.

En primates se han descrito dos grupos principales y otros dos más de menor entidad:

- Células ganglionares $P\alpha$, también denominadas células ganglionares en sombrilla: son células de gran tamaño.

- Células ganglionares $P\beta$, o células ganglionares enanas: son células de pequeño tamaño.

- Células ganglionares $P\gamma$: son células de menor entidad y están mal conocidas³⁷.

- Células ganglionares biestratificadas: también tienen menor entidad^{37,96}.

En reptiles la capa ganglionar está constituida por las células ganglionares³⁰. Los cuerpos celulares de las células ganglionares están parcialmente cubiertos por las células de Müller, pero existen algunos contactos directos con otras células ganglionares⁹⁷. Desde las células ganglionares parten las fibras nerviosas que constituirán el nervio óptico³⁰.

Desde el punto de vista funcional, en el gato se han puesto en evidencia dos categorías principales⁹⁸:

- Células ganglionares centro-ON/periferia-OFF. Las células ganglionares centro-ON/periferia-OFF tienen una potencia de descarga del influjo que aumenta cuando la luz está presente en el centro y ausente en la periferia de su campo receptor.

- Células ganglionares centro-OFF/periferia-ON. Las células ganglionares centro-OFF/periferia-ON tienen una potencia de descarga del influjo que aumenta cuando la luz está ausente en el centro y presente en la periferia de

su campo receptor. Estas dos categorías se reparten aproximadamente por toda la retina.

Si tenemos en cuenta los campos receptores, también en el gato, se pueden dividir en dos categorías⁹⁹:

-Células ganglionares X. Las células ganglionares X tienen unos campos receptores pequeños, dan unas respuestas tónicas a los haces de luz estacionaria, son relativamente poco sensibles a los estímulos en movimiento y presentan una suma espacial lineal de las influencias que parten de las regiones antagonistas de su campo receptor.

-Células ganglionares Y. Las células ganglionares Y tienen unos campos receptores de gran tamaño, dan unas respuestas fásicas, responden fuertemente a los estímulos animados de un movimiento rápido y no presentan una suma espacial lineal entre el centro y la periferia de su campo receptor. Estos dos grupos tienen unos campos receptores concéntricos y antagonistas.

Se han descrito otras células ganglionares denominadas células ganglionares W, que son activadas por un estímulo que, sin importar su contraste, se desplaza en una dirección determinada¹⁰⁰ y no existe antagonismo entre el centro y la periferia de su campo receptor¹⁰¹.

Aparte se ha podido establecer una excelente correlación entre³⁷:

-Las células ganglionares α y las células ganglionares Y.

-Las células ganglionares β y las células ganglionares X.

-Las células ganglionares γ y δ y las células ganglionares W.

Según la clasificación anatómico-funcional descrita en primates^{37,96}, las células ganglionares $P\alpha$ están presentes en toda la retina y tienen unos campos receptores extensos y organizados en dos zonas concéntricas y antagonistas. Estas células reciben en el centro y en la periferia de su campo receptor unas señales del mismo signo sináptico procedente de conos M o L. Así pues, las sensibilidades espectrales de las células ganglionares $P\alpha$ son mayores que las de los conos y, por lo tanto, no pueden dar información sobre la posición espectral de la luz que las estimula, pero se activan por unos estímulos de muy débil contraste. Las células ganglionares $P\alpha$ son el origen del

trayecto M (magnocelular) destinado a las capas ventrales del cuerpo geniculado lateral (capas 1 y 2). Las células de la vía M codifican fundamentalmente la luminancia y el movimiento³⁷.

Las células ganglionares P β son las más numerosas y tienen sus campos receptores poco extensos y organizados en dos zonas concéntricas, antagonistas y de sensibilidad espectral diferente. Estas células ganglionares reciben en el centro y en la periferia de su campo receptor las señales de signo sináptico opuesto provenientes de los diferentes tipos de conos. Una célula L/M tendrá un centro estimulado por una luz situada en las grandes longitudes de onda -L-, y una periferia inhibida por una luz situada en las longitudes de onda media -M-. Cuando el centro y la periferia del campo receptor se estimulan por un haz de luz cromático, la respuesta de la célula reflejará el matiz de sensibilidad espectral de los diferentes tipos de conos que contribuyen a la respuesta; la curva de sensibilidad espectral de la célula ganglionar en cuestión será menor que la de los conos. Las células ganglionares P β presentan, en efecto, los dos mecanismos: cromático y acromático. Poseen dos campos receptores de pequeño tamaño y por consiguiente una gran selectividad por las altas frecuencias espaciales, lo que le da una elevada agudeza en visión acromática. Por lo tanto tienen una doble función³⁷:

-Resaltar el contraste cromático a bajas frecuencias espaciales.

-Resaltar el contraste de luminancia a altas frecuencias espaciales.

Las células ganglionares P β son el origen del trayecto P o parvovelular destinado a las capas dorsales del cuerpo geniculado lateral (capas 3 a 6). La vía P es la responsable de la agudeza y el color.

Es importante saber que las células ganglionares P β que reciben influjos de los conos S, lo hacen por intermediación de las células bipolares de los conos S con la exclusión de todas otras informaciones por lo que constituyen una vía S sobre los cuerpos geniculados laterales³⁷.

Las células ganglionares P γ tienen propiedades variadas, complejas y mal conocidas. Desempeñan ciertos papeles especializados, por ejemplo en la detección de los niveles absolutos de alumbramiento o codificación de la dirección de los movimientos de imágenes sobre la retina. Son el origen de la

vía K o koniocelular destinada a las capas interlaminares de los cuerpos geniculados laterales y al coliculus superior. La vía koniocelular podrá asegurar una función de modulación de la actividad de las vías visuales³⁷.

Ciertas células ganglionares biestratificadas reciben las señales estimuladoras de los conos S y las señales inhibitoras de los conos L y M⁹⁶; otras reciben las señales inhibitoras de los conos S³⁷.

Al igual que las células bipolares, las células ganglionares ON y OFF funcionan conjuntamente. Hay, por lo tanto, una vía bipolar/ganglionar ON y una vía bipolar/ganglionar OFF que se mantienen separadas hasta el cortex³⁷.

3.13. La capa nuclear interna

En los mamíferos la capa nuclear interna contiene los cuerpos celulares de las células horizontales más largas, de las células bipolares, de las células amacrinas desplazadas y de las células interplexiformes³⁵.

En los reptiles la capa nuclear interna tiene dos niveles. Los cuerpos celulares de las células amacrinas se encuentran en el nivel interno y los cuerpos celulares de las células horizontales³⁰, las células bipolares grandes y los cuerpos celulares de las células bipolares pequeñas, en el nivel externo⁷⁶.

3.14. La capa plexiforme interna

En mamíferos esta es la región del intercambio sináptico entre las células bipolares, amacrinas y ganglionares. En esta capa se ven frecuentemente sinapsis recíprocas entre las terminales de las bipolares y las dendritas de las células amacrinas. En este tipo de sinapsis la célula bipolar contacta con la célula amacrina como elemento presináptico de una sinapsis en cinta y la célula amacrina vuelve a establecer una sinapsis convencional de retroalimentación con la célula bipolar. De este modo, las dendritas de las células amacrinas adquieren la propiedad excepcional de contener vesículas sinápticas y comportarse como elementos presinápticos de sinapsis dendroaxónicas y dendrodendríticas³⁵.

En reptiles está constituida por las evaginaciones descendentes de las células bipolares y amacrinas³⁰.

3.15. La membrana limitante interna

En mamíferos este término tradicional ya no es adecuado porque la microscopía electrónica ha demostrado que no es realmente una membrana, sino simplemente la lámina basal de las células de Müller, que separa sus extremos cónicos internos del cuerpo vítreo³⁵.

En los reptiles, por ejemplo en el género *Phelsuma*, la membrana limitante interna está compuesta por dos capas y también llegan algunas fibras de las células bipolares pequeñas³⁰.

3.16. Los elementos neurogliales de la retina

La retina, por ser una parte modificada del cerebro, contiene células de soporte de carácter neuroglial. En mamíferos estas células son las células de Müller³⁵. Las células de Müller son células gliales que forman un tejido nutricional y de soporte sobre el cual descansa el conjunto de la retina neurosensorial¹⁰². Además, las células de Müller se encargan de captar los iones K^+ que liberan las células bipolares¹⁰³.

Las células de Müller están presentes por toda el área central, incluyendo la fovea, lo mismo que en la periferia. Sus núcleos ovoides están situados en la zona media de la capa nuclear interna. El cuerpo celular es una columna delgada que se extiende radialmente desde la membrana limitante interna hasta la membrana limitante externa³⁵.

En el límite entre la capa nuclear externa y la capa donde se encuentran las células fotorreceptoras, las células de Müller presentan unas zónulas *adherens* muy desarrolladas que producen la densidad lineal que se interpreta como membrana limitante externa³⁵.

En los reptiles también encontramos células de Müller. Estas células atraviesan todas las capas de la retina. Su citoplasma es fibrilar y las mitocondrias se sitúan en la zona de la membrana limitante externa. El núcleo se encuentra cerca de la membrana limitante interna³⁰.

3.17. La fóvea

En mamíferos la fóvea es una depresión cónica en la retina situada ligeramente por debajo de la salida de las fibras del nervio óptico. Alrededor de la fóvea se encuentra una zona de coloración amarilla de forma ovoidea que se denomina *mácula lútea*. En la fóvea los vasos sanguíneos retinianos están ausentes y las capas internas retinianas están aplanadas lateralmente de forma que presenta una mínima barrera a la llegada de los fotones a los fotorreceptores. En la fóvea los fotorreceptores son en su mayoría conos³⁸, con una densidad que varía según razas e individuos¹⁰⁴, y que guardan una proporción de uno a uno con las fibras nerviosas ópticas. Todas estas características hacen que la fóvea esté sujeta a una mínima distorsión de refracción y que sea la zona de máxima agudeza visual³⁸. En reptiles la fóvea varía según la especie. Por ejemplo, dentro del suborden Sauria (saurios) el género mejor estudiado es el género *Anolis*. En el género *Anolis* existe una fóvea central y una fóvea temporal. En la fóvea central -que se encuentra ligeramente temporal- las células fotorreceptoras son tan delgadas que es materialmente imposible reconocer su ultraestructura³⁰.

La fóvea temporal en el género *Anolis*, el único género no aviar conocido que presenta una segunda fóvea, se encuentra aproximadamente a dos tercios de la línea imaginaria que uniría la fóvea central con la *ora serrata* temporal. La fóvea temporal es redonda en su comienzo, pero en el centro es cónica, lo cual es una configuración bastante inusual. Esta segunda fóvea podría ser una adaptación a los hábitos arborícolas en éste género³⁰. En la especie *Iguana iguana* la fóvea central se encuentra muy bien desarrollada². En el suborden Amphisbaena (anfísbénidos)³⁰ y en las familias Anniellidae¹⁰⁵, Dibamidae³⁰, Helodermatidae¹⁰⁵, Pygopodidae, Gekkonidae y Xantusiidae, sin embargo, carecen de fóvea³⁰.

En el suborden Ophidia (ofidios) no se encuentra descrita en la literatura bibliográfica consultada la presencia de ninguna fóvea. En el género *Sphenodon* -el único género actual del Orden Rhynchocephalia- la fóvea se encuentra muy bien desarrollada y se sitúa en el polo orbital³⁰.

Dentro del orden Testudines (quelonios) solamente en el género *Trionyx* encontramos una fovea verdadera³⁰.

En el resto de géneros de los testudines y en todo el orden Crocodylia (crocodilianos) sólo encontramos una zona que se corresponde con el área central sin presencia alguna de fovea como tal³⁰.

3.18. El soporte trófico vascular

En los mamíferos el soporte trófico vascular nace de la arteria oftálmica y puede subdividirse en dos grupos, que son casi totalmente independientes y que se anastomosan uno con el otro sólo en la región de entrada del nervio óptico³⁵:

-Sistema retiniano: está representado por la arteria y la vena centrales e irriga una parte del nervio óptico y la porción interna de la retina.

-Sistema ciliar: nutre la úvea y a través de ella irriga a la retina externa.

A semejanza del cerebro, la retina está protegida de las macromoléculas circulantes por los vasos sanguíneos mediante la barrera hemato-retiniana. La base estructural de esta barrera está representada fundamentalmente por las zónulas *occludens* que sellan los espacios intercelulares que hay entre las células del epitelio pigmentario y las que existen entre las células endoteliales de los vasos sanguíneos retinianos³⁵.

En los reptiles la retina es anangiótica, por lo que el soporte trófico vascular se establece a través de los vasos coroidales, que proceden de la arteria oftálmica que llega junto al nervio óptico y/o del cono papilar³⁰.

El cono papilar es una estructura similar al *pecten* de las aves que avanza desde la cabeza del nervio óptico hacia el vítreo²⁹ y que probablemente tiene una función trófica similar a la que cumple en aves¹⁰⁶. En reptiles el cono papilar es perfundido por un vaso hialoideo que llega desde la zona de entrada del nervio óptico³⁰.

En los saurios el cono papilar lo podemos encontrar en las familias Iguanidae, Agamidae, Lacertidae, Teiidae, Anguidae, Scincidae (sólo en los de

hábitos no fosoriales), Varanidae³⁰ y Anniellidae⁵³ en los cuales generalmente tiene una sección circular.

En las familias Pygopodidae, Gekkonidae y Xantusiidae, que tienen en su mayoría especies de hábitos nocturnos, también encontramos la existencia de un cono papilar; sin embargo los reptiles de hábitos fosoriales, anfisbénidos y escíndidos fosoriales no tienen cono papilar³⁰.

En los ofidios también se pueden encontrar géneros que no poseen cono papilar sino una vascularización procedente de una arteria hialoidea, como sucede, por ejemplo, en las familias Typhlopidae y Leptotyphlopidae⁵². En las especies que poseen cono papilar, éste se encuentra unido a la retina mediante tejido de naturaleza mesodérmica y no neuroglial, como sucede en lacértidos y en aves. Ocasionalmente ocurre que, como se encuentra descrito en *Malpolon*, algunos capilares simplemente pasan a la cámara posterior perdiéndose en el humor vítreo. En *Sphenodon* la retina es avascular y no posee cono papilar³⁰.

Los quelonios y crocodilianos tienen retina avascular y tampoco poseen cono papilar³⁰.

3.19. Inervación de la retina

En los mamíferos, a causa de la presencia de la fovea central, las fibras del nervio óptico tienen un curso especial. En general, convergen radialmente hacia la papila óptica; sin embargo, las que proceden del cuadrante temporal superior de la retina circundan por encima la *mácula lútea*, mientras que las que se originan en el cuadrante temporal inferior la rodean por debajo en su camino hacia la papila siguiendo el trayecto de los grandes vasos retinianos. Esta separación se preserva a lo largo de la vía visual central hasta la corteza cerebral. Las fibras de la mitad nasal decusan en el quiasma óptico y pasan al tracto óptico del lado contrario, mientras que las del lado temporal siguen el tracto del mismo lado³⁵.

En los reptiles el nervio óptico aparece en la zona temporoventral del ojo y se dirige a los centros de visión del cerebro. Está constituido por las fibras eferentes de la retina y rodeadas por tejido de neuroglía³⁰. En su paso por el

quiasma óptico las fibras que lo componen no decusan de manera completa, llegando una parte pequeña a los centros ipsilaterales de la visión del cerebro¹⁰⁷.

En los ofidios encontramos la existencia en el nervio óptico de numerosas fibras aferentes¹⁰⁸ que posiblemente proporcionan el estímulo vasomotor a la vascularización hialoidea³⁰. En *Sphenodon* el nervio óptico carece de septos, que están compuestos de tejido conectivo y separan grupos de fibras eferentes, al contrario de lo que sucede en ofidios, en los que sí encontramos dichos septos³⁰.

3.20. El tratamiento retiniano de la función visual

La imagen óptica que se realiza en el fondo de ojo es una distribución bidimensional continua de luz. Esta imagen será muestreada por el mosaico de fotorreceptores que traducen el contenido energético de la luz que les llega en señales electro-iónicas. La señal electro-iónica así generada controla la liberación de un neurotransmisor (capa plexiforme interna), que actúa sinápticamente sobre las células retinianas horizontales y bipolares. Las señales sinápticas generadas por las células bipolares y elaboradas por las células amacrinas, serán transformadas en una serie de representaciones neuronales discretas por las células ganglionares. Los campos receptores permiten reducir en alguna medida la imagen, calculando sobre las superficies, más o menos importantes, del mosaico retiniano los contrastes locales³⁷.

Por último, existen trayectos que unen las distintas clases de fotorreceptores con las distintas categorías de células ganglionares. Esto permite transmitir informaciones diferentes: espaciales, espectrales, de alta o baja frecuencia, temporales fásicas o tónicas...antes de codificarlas bajo forma de potenciales de acción propagados al nivel de los segmentos iniciales de los axones de las células ganglionares y dirigirlos, en forma de mensajes discretos, a las estructuras centrales del cerebro. De esta manera, la información contenida en la imagen retiniana será representada al nivel de las células ganglionares de la manera más económica y más fiel posible, puesto que todo lo que el cerebro va a utilizar para sus comportamientos visuales debe pasar

por los axones de las células ganglionares. Un fotorreceptor activado produce un influjo que se dispersa hacia posiblemente ocho células ganglionares, donde la actividad es modificada, más o menos, después de esta estimulación³⁷.

Sin embargo, la actividad de una célula ganglionar resulta de la integración de los influjos de 500 a 1700 fotorreceptores, realizando la convergencia retiniana de la información. Esta forma de funcionamiento por mecanismos de divergencia/convergencia de la información es el origen de una mejora en el cociente señal/ruido, permitiendo al cerebro percibir estimulaciones de muy débil nivel luminoso. Para las estimulaciones de nivel luminoso más elevadas, este tipo de funcionamiento permite la obtención de una respuesta sincronizada de un conjunto de ruidos neurónicos aleatorios en el origen de una percepción³⁷.

4. La técnica electroretinográfica

La electroretinografía es un método de exploración ocular que registra, mediante un equipo electroretinográfico, el conjunto de acontecimientos electrofisiológicos que se generan en la retina como consecuencia de una estimulación luminosa^{6,9,109} y que se expresa gráficamente en las diferentes ondas que constituyen el electroretinograma (**ERG**)⁹. Estas ondas se pueden interpretar tanto cualitativa como cuantitativamente¹¹⁰. Estos acontecimientos representan la suma de todas las corrientes extracelulares radiales generadas por las células de la retina y que fluyen por el circuito formado por retina, vítreo, cristalino, cámara posterior, cámara anterior, córnea, esclera, coroide y epitelio pigmentario⁹. La respuesta de la retina obtenida tras una estimulación luminosa es proporcional a la superficie retiniana funcional⁶.

El examen electroretinográfico hay que realizarlo en un contexto clínico preciso⁶, es decir, que previamente hay que conocer sus limitaciones y sus indicaciones clínicas. Esto se pone de manifiesto con el ejemplo de un animal con ceguera de origen central o debida a una afección en el nervio óptico. En estos casos el examen electroretinográfico no está indicado puesto que, éste solamente valora la funcionalidad retinal, pero no el nervio óptico ni los tractos ópticos superiores.

El estímulo luminoso utilizado, las condiciones ambientales y el manejo de los registros se encuentran actualmente protocolizados, tanto en medicina humana como en medicina veterinaria^{21,111,112}.

La cadena de acontecimientos que se realiza en una electroretinografía es la siguiente: primero hay que producir una estimulación luminosa, luego recoger la señal producida, amplificarla, filtrarla y, finalmente, digitalizarla mediante un software específico^{6,110}.

4.1. Parámetros a controlar

Para realizar de manera adecuada un examen electroretinográfico e interpretar correctamente los resultados hay que controlar los distintos parámetros que influyen en la técnica electroretinográfica, y pre-establecer los

valores indicados en el protocolo que se esté usando. Las características de los diferentes parámetros que influyen en la electroretinografía son^{1,6,9}:

- Características de la estimulación.
- Características del paciente y su preparación.
- Características del estado de adaptación de la retina en el momento del examen.
- Características de la recogida y del tratamiento de la señal.

Todos estos parámetros deben ser perfectamente conocidos con el fin de poder realizar unos exámenes cortos, de un máximo de información y reproducibles⁶.

4.1.1. Características de la estimulación

La estimulación luminosa interesa que llegue de manera homogénea a toda la superficie retinal⁶, por eso hoy en día se utiliza un fotoestimulador tipo Ganzfeld. El fotoestimulador tipo Ganzfeld tiene una forma geométrica de media esfera con el tamaño adecuado para englobar la totalidad de la cabeza del paciente¹¹³.

La estimulación se caracteriza por^{6,9}: La composición espectral, la luminancia de la fuente emisora y la frecuencia con que es emitida. Estas características también nos van a permitir separar preferentemente la actividad del circuito asociado a los conos o la del asociado a los bastones^{6,9}.

a) Composición espectral

La composición espectral se caracteriza por la cantidad de variación cromática y por la longitud de onda del espectro utilizado. En cuanto a la variación cromática podemos utilizar un haz de luz monocromático, heterocromático o acromático.

En cuanto al tipo de longitud de onda (λ), ésta permite estimular de manera más específica un tipo de fotorreceptor u otro^{6,9}. El conocimiento de las curvas de sensibilidad espectral de los fotorreceptores de cada especie evaluada, y de las curvas de absorción espectral de los filtros colorimétricos

usados es un prerequisite indispensable a la hora de utilizar estimulaciones cromáticas⁶.

b) Luminancia

La luminancia influye tanto a nivel cuantitativo como cualitativo. A nivel cuantitativo influye estimulando todos los tipos de fotorreceptores o preferentemente un solo tipo de fotorreceptor según el nivel de luminancia utilizado. En la retina humana los bastones responden a luminancias entre -6 y $2 \log \text{ cd/m}^2$; sin embargo los conos responden a un rango de luminancia de -1 a $8 \log \text{ cd/m}^2$ ¹¹⁴. A nivel cualitativo es necesario estimular una superficie retiniana máxima y de manera homogénea; para conseguirlo se puede utilizar bien el sistema tipo Ganzfeld^{15,21}, bien unos estimuladores reglados bilaterales^{6,24}.

c) Frecuencia

Para poder registrar un ERG es necesario poner en actividad la retina con una variación breve de la estimulación. Se pueden utilizar dos tipos de estimulaciones⁶:

-ERG obtenido mediante estimulación tipo flicker

La estimulación tipo flicker es una estimulación repetida en el tiempo a una frecuencia alta para los fotorreceptores. Esta frecuencia de repetición no permite al sistema visual evolucionar libremente. Sólo responden los fotorreceptores capaces de seguir un ritmo rápido de variaciones de luminancia⁶. En el perro los circuitos puestos en funcionamiento para frecuencias superiores a 30 Hz se corresponden con los de los conos²¹; sin embargo, la frecuencia para una estimulación tipo flicker en los bastones se sitúa en 10 Hz^{21,112}. Las gráficas obtenidas tras una estimulación tipo flicker son una sucesión de ondas **b**, en las que mediremos las amplitudes y los tiempos absolutos desde un pico máximo a otro²¹.

-ERG obtenido mediante estimulación tipo flash

Es una estimulación breve y repetida en el tiempo a baja frecuencia para los fotorreceptores. Esta estimulación permite la sincronización de la respuesta del conjunto de las células visuales, pues posibilita al sistema visual

evolucionar libremente⁶. En el perro el rango utilizado en el ERG tipo flash es de 0,1 a 5,1Hz^{21,112}.

4.1.2. Características del paciente y su preparación

Existe una gran variabilidad morfológica¹¹⁵ y anatómica tanto interespecífica como intraespecífica del cráneo, globo ocular y retina⁹, además de las diferencias fisiológicas interespecíficas del sistema visual que influye en el ERG, con lo cual el conocimiento de estas diferencias es un prerequisite indispensable en el establecimiento de un protocolo y en la interpretación de los resultados^{21,25,115}.

Puesto que la calidad de la señal recogida depende de la iluminación retiniana⁶ es indispensable, para asegurar una estimulación luminosa completa en la retina, que el animal esté anestesiado con los párpados bien abiertos, con ambas pupilas midriáticas^{9,116} y con los globos oculares fijos¹¹⁶.

En cuanto a la anestesia, ésta debe permitir como requisito, que se pueda hacer lo siguiente:

- Realizar un protocolo de electroretinografía de al menos 30 minutos¹¹⁶.

- No modificar, o modificar poco, el ERG¹¹⁶. La modificación en el ERG suele ser una disminución de los valores electroretinográficos¹¹⁷, sobre todo debido a los efectos de la disminución de la PaO₂ a nivel retinal¹¹⁸.

- Permitir una buena miorelajación para evitar el registro de electromiogramas que puedan interferir en el registro electroretinográfico¹¹⁶.

- Inhibir el reflejo fotomioclónico¹¹⁹.

4.1.3. Características del estado de adaptación de la retina en el momento del examen

El nivel luminoso del ambiente en el que se efectúa el examen condiciona el estado de adaptación de la retina por la necesidad de efectuar la estimulación cuando la concentración de las reservas iónicas disponibles en el espacio sub-retiniano está equilibrada, es decir, cuando la adaptación de la

retina a la luz o a la oscuridad es estable. Por lo tanto, el estado de adaptación de la retina permite seleccionar el tipo de fotorreceptor que se desee estudiar^{6,9,112}. En el perro el estudio del funcionamiento de los conos se efectuará en un ambiente fotópico ($30-40 \text{ cd/m}^2$)¹¹² en el que los bastones se encuentran saturados; sin embargo, el estudio del funcionamiento de los bastones se efectuará en un ambiente escotópico por debajo del umbral de respuesta de los conos ($0,02-0,03 \text{ cd/m}^2$)^{6,112}. En el perro la adaptación fotópica se logra a partir de diez minutos en un ambiente fotópico y la adaptación escotópica se logra a lo largo del proceso dinámico que resulta del conjunto de estimulaciones escotópicas que se realizan en el paciente^{21,112}.

4.1.4. Características de la recogida y del tratamiento de la señal

Ya se ha mencionado, en un apartado anterior, que un factor que disminuye el ruido de fondo es una correcta anestesia para impedir un exceso de actividad electromiográfica¹¹⁶. Aparte de la anestesia existen diversos aspectos técnicos en la recogida y el tratamiento de la señal indispensables para ayudar a eliminar un excesivo ruido de fondo que nos impida o dificulte la correcta interpretación del ERG^{1,6,110}.

La recogida de la señal producida por la estimulación se hace mediante tres tipos de electrodos: uno positivo –o activo- que se sitúa en la superficie corneal, otro negativo –o de referencia- que se puede situar en la piel o debajo de ésta, y uno de toma de tierra. El electrodo positivo debe situarse lo más cerca posible de la génesis del potencial; por eso se coloca en la córnea; estos electrodos se han desarrollado con forma de lente de contacto para minimizar el posible daño a la córnea y el malestar que puedan producir. Además, como tienen una gran superficie de contacto, recogen mejor la señal procedente de la retina¹¹⁰.

El electrodo de referencia se coloca un poco más alejado del positivo y sirve para establecer la diferencia con respecto al positivo. El electrodo de toma de tierra sirve como referencia del valor cero, por lo que la polaridad –negativa o positiva- del potencial recogido depende de la referencia marcada por este electrodo. La diferencia entre el electrodo positivo y el negativo llega a un

amplificador. El cometido del amplificador es rechazar las señales de ruido de fondo y amplificar las señales que interesan. Este proceso se denomina CMR (common mode rejection) y se basa en la eliminación de las señales que resultan parecidas entre el electrodo positivo y el negativo, y amplifica las señales que resultan diferentes. Además, el amplificador también actúa como filtro. Este filtro se establece mediante el ancho de banda, que es el rango de frecuencias –procedentes de la retina y amplificadas- que van a ser digitalizadas por un convertidor de señal analógica a digital para mostrarlas en la pantalla del ordenador. El ancho de banda lo establece el usuario del equipo y es el que permite la visualización de las ondas que nos interesan¹¹⁰.

Otro aspecto importante es la impedancia de los electrodos y del amplificador. Para evitar pérdidas en el voltaje es necesario que las impedancias de los electrodos corneales y de referencia estén balanceadas y que la impedancia del amplificador sea mucho mayor -al menos cien veces- que la de los electrodos¹¹⁰.

Por último, otro mecanismo encaminado a incrementar el cociente señal/ruido consiste en realizar un promedio de varios estímulos¹²⁰.

4.2. Interpretación de un ERG

El ERG está constituido por una sucesión de ondas caracterizadas por su morfología, su amplitud y su tiempo de latencia (Figura 2).

-Morfología: el típico ERG consiste en una sucesión de tres ondas denominadas, según el orden de aparición en el ERG, **a**, **b** y **c**¹²¹.

-Amplitud: es el valor máximo oscilatorio medido en μV (microvoltios)⁶.

-Tiempo de latencia: es el tiempo en ms (milisegundos) que transcurre entre el inicio de una estimulación y su respuesta máxima⁶.

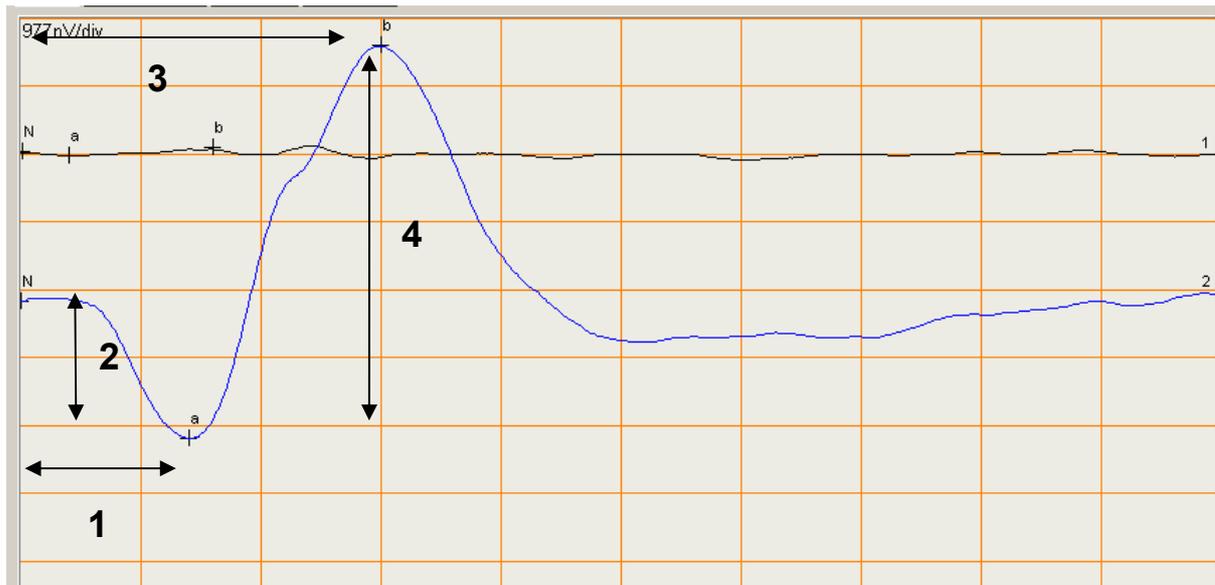


Figura 2. Morfología, ondas e interpretación de un ERG. 25 ms/div. 1. Tiempo de latencia de la onda **a** 2. Amplitud de la onda **a** 3. Tiempo de latencia de la onda **b** 4. Amplitud de la onda **b**. (Comunicación personal Alejandro Bayón, 2006).

4.2.1. La onda **a**

La onda **a** aparece en primer lugar (Figura 2), es una onda negativa y de corta duración^{1,122} (Figura 2). Sigue la cinética de la hiperpolarización -cierre de los canales del sodio- de los fotorreceptores, bajo la acción del influjo fotónico. Tiene un pico negativo máximo, y se desglosa en una onda **a1**, que se corresponde con la actividad de los conos, y una onda **a2**, que se corresponde con la actividad de los bastones⁶.

La amplitud de la onda **a** se mide desde la línea basal hasta la depresión de la misma^{6,9,10,21,112,122} y depende del número de fotorreceptores estimulados; de ahí la importancia de una iluminación retiniana completa⁶. El tiempo de latencia se mide desde el comienzo del estímulo hasta el pico de depresión máxima^{6,9,10,21,112,122} y depende del buen funcionamiento de las células estimuladas⁶.

4.2.2. La onda b

La onda **b** aparece a continuación de la onda **a** (Figura 2). Es una onda positiva y de mayor amplitud y duración que la onda **a**^{1,122} (Figura 2). Acerca del origen de la onda **b** existen actualmente dos teorías⁹. Una teoría apunta como origen de la onda **b** a las células bipolares que funcionalmente son Centro-ON¹²⁴ y a la existencia de una modulación en su amplitud y cinética por parte de las células amacrinas y ganglionares¹²⁵. La otra teoría describe que la onda **b** sigue la cinética de la despolarización de las células de Müller; despolarización que depende de los cambios inducidos por el estímulo luminoso en la concentración extracelular de iones de K^+ ; también señala esta teoría que la onda **b** se compone de una onda **b1**, que corresponde a la actividad de las células de Müller ligadas a la actividad de los conos, y una onda **b2**, correspondiente a la actividad de las células de Müller ligadas a la actividad de los bastones⁶.

La amplitud de la onda **b** se mide desde la depresión de la onda **a** hasta el pico de la onda **b**^{6,9,10,21,112,122} y depende del número de fotorreceptores inicialmente estimulados^{6,16}. El tiempo de latencia se mide desde el inicio del estímulo hasta su pico máximo^{6,9,10,21,112,122} y depende del buen funcionamiento de las células estimuladas⁶.

4.2.3. La onda c

Esta onda aparece en el ERG cuando la estimulación se mantiene al menos un segundo y se origina en el epitelio pigmentario^{6,9}. Es una onda positiva con una pendiente muy suave¹, pero no tiene mucho interés a nivel clínico debido a que no se suele alterar en procesos patológicos¹ y a que aparece aproximadamente en un tercio de los ERGs realizados en perros adultos sanos¹²⁶.

4.2.4. Los potenciales oscilatorios (POs) u ondas e

Los POs se corresponden con la actividad de las células amacrinas. Estas ondas se encuentran en la parte ascendente de la onda **b**⁶ y pueden

dificultar la localización del pico de la onda **b**¹. Para obtenerlas adecuadamente hay que usar un ancho de banda entre 100-300 Hz. Los POs son bastantes sensibles a la isquemia, incluso en pequeñas áreas retinales; por tanto es un buen indicador en la retinopatía diabética¹²⁷.

4.3. Indicaciones clínicas de la electroretinografía

La evaluación de la funcionalidad de la retina se realiza mediante el estudio de las variaciones morfológicas y, sobre todo, de los valores electroretinográficos obtenidos mediante un protocolo determinado. Cualquier retinopatía que implique una superficie retinal amplia dará como resultado un ERG en el cual las amplitudes estarán disminuidas y los tiempos absolutos, aumentados; sin embargo, las lesiones retinales focales pueden disminuir las amplitudes, aunque sin alterar los tiempos absolutos¹²⁸. Las indicaciones clínicas del examen electroretinográfico son las siguientes.

-Diagnóstico de patologías hereditarias

Se ha demostrado que la electroretinografía es una técnica particularmente interesante a la hora de diagnosticar patologías hereditarias de manera precoz, es decir, previamente a la aparición de signos clínicos oftalmológicos y/o etológicos, en diferentes especies y patologías, como, por ejemplo, en las siguientes.

-En la atrofia progresiva de retina (PRA) en el perro, en la que se produce una degeneración progresiva de los bastones, reduciéndose la funcionalidad escotópica, y que evoluciona hacia una degeneración de los conos, produciéndose una atrofia de toda la retina. En estos casos se produce una disminución de las amplitudes y un aumento de los tiempos de las diferentes ondas del ERG en estadios muy tempranos de la enfermedad cuando la degeneración de los fotorreceptores no es lo suficientemente extensa como para provocar algún tipo de ceguera¹²⁹⁻¹³⁶.

-En la ceguera nocturna estacionaria congénita (CSNB) en la raza canina Briard electroretinográficamente se puede diagnosticar a las cinco

semanas de vida manifestándose mediante una disminución de la amplitud de la onda **a** y **b** en el estudio escotópico y en el flicker^{20,137,138}.

-En la atrofia progresiva de retina en el gato se produce bien un ERG plano en gatos jóvenes, bien una disminución de las amplitudes en gatos adultos¹³⁹⁻¹⁴².

-Diagnóstico del síndrome de retina silenciosa (SARD)

En este síndrome el cuadro clínico se caracteriza por ceguera aguda, fundoscopia normal, midriasis arresponsiva y ERGs planos^{21,143-146}.

-Evaluación de la funcionalidad retinal cuando existen alteraciones de los medios transparentes anteriores del ojo

Cualquier alteración en la transparencia de la córnea o del cristalino (p.ej.: cataratas, edema corneal, distrofias corneales, opacificaciones de cristalino, hemorragias vítreas...) va a impedir una exploración mediante oftalmoscopia directa, indirecta y/o cámara de retinografía que permita una visualización anatómica del fondo de ojo. En estos casos el examen electroretinográfico se convierte en la herramienta diagnóstica exclusiva y fundamental para evaluar la funcionalidad retinal^{1,6,21,24,147} más aún teniendo en cuenta la alta prevalencia de la asociación de cataratas con atrofia progresiva de retina^{1,25,147}. Hay que tener en cuenta que toda alteración de la transparencia de los medios anteriores (córnea, cámara anterior, cámara posterior, cristalino, membrana hialoidea y vítreo) puede modificar el resultado^{6,9}, aunque dichas opacificaciones no disminuyen ni eliminan los valores electroretinográficos, incluso en algunos casos puede aumentar las amplitudes¹⁴⁸.

-Glaucoma

El ERG es una técnica útil para detectar la pérdida, por la degeneración provocada por la anoxia prolongada, de fotorreceptores debido a aumentos de presión intraocular como ocurre en el glaucoma^{147,149}.

-Técnica diagnóstica de *screening* ante intoxicaciones, así como para realizar evaluaciones de xenobióticos retino-tóxicos

Se ha podido evaluar mediante electroretinografía intoxicación por mercurio en cocodrilos¹¹; además, existe un protocolo electroretinográfico en modelo canino para *screening* toxicológico¹⁵⁰. También sirve para realizar evaluaciones de fármacos retino-tóxicos¹⁵¹. La electroretinografía también se muestra como una herramienta de diagnóstico útil en los estudios farmacológicos de xenobióticos retino-tóxicos⁶, para los cuales se utilizan animales de experimentación como biomodelos²³.

-Trastornos del comportamiento

La electroretinografía puede ser un examen complementario útil para el etólogo, pues un trastorno de la función visual puede traducirse en modificaciones del comportamiento, en ausencia de otros signos clínicos u oftalmológicos^{6,24} como, por ejemplo, puede suceder en comportamientos de apatía en general, agresividad en perros y caballos, anorexia en reptiles...

-Retinopatía degenerativa debido a deficiencia de taurina en la dieta en gato

Es una patología que actualmente es extremadamente rara debido a la extendida utilización de dietas comerciales en la alimentación de los gatos mantenidos como mascotas. En esta patología la amplitud de la onda **a** y **b** se encuentra disminuida y los tiempos, aumentados en el ERG fotópico^{152,153,154}.

-Diagnóstico de la nyctalopia parcial congénita en caballos

Se manifiesta con una ausencia de onda **b** en el estudio escotópico y ERG fotópico con amplitudes disminuidas^{155,156,157}.

5. El examen electroretinográfico en el perro

En el congreso ECVO-ESVO celebrado en Viena en el año 2000 se creó una comisión con el fin de establecer las directrices generales para la realización de un examen electroretinográfico en el perro y con la intención de realizar revisiones periódicas de dichos protocolos. Como fruto de aquella primera reunión salieron a la luz los primeros protocolos electroretinográficos para la especie canina¹¹². El protocolo descrito a continuación es el utilizado en los casos que requieran una evaluación completa y estricta de la funcionalidad

retinal, ya que existe otro protocolo solamente para los casos de evaluación rápida del funcionamiento de la retina para descartar o no la realización de la cirugía en un paciente con cataratas²¹.

5.1. Evaluación de la función de los bastones

a) Adaptación a la oscuridad

-La adaptación a la oscuridad debe durar, al menos, 20 minutos¹¹².

-El proceso dinámico de la adaptación a la oscuridad debe ser evaluada mediante un examen periódico. Este examen consistirá en la realización de una electroretinografía cada 5 minutos, para un total de cuatro electroretinografías dentro de los 20 minutos de adaptación a la oscuridad, con estímulos de baja intensidad¹¹².

b) El estímulo luminoso

-El color recomendado del estímulo luminoso es el uso de luz blanca, aunque el uso de luz cromática está permitido¹¹².

-La intensidad del estímulo debe ser producida mediante un flash de baja intensidad. La intensidad del flash debe ser de 2 unidades logarítmicas por debajo del flash estándar (FE) -el utilizado para la evaluación de los conos- o entre 0,02-0,003 cd/m²/seg. Hay que tener en cuenta que el uso de filtros cromáticos atenúa la intensidad del estímulo¹¹².

-Un único destello, repetido a intervalos de 5 minutos, es suficiente para evaluar la función de los bastones y el proceso de adaptación a la oscuridad. En el caso de que un clínico decida hacer la media de las respuestas a varios estímulos, estos deben presentarse a una frecuencia igual o menor de 0,5 Hz. No está recomendado promediar más de cuatro estímulos¹¹².

c) El ERG flicker

La respuesta al flicker en los bastones debe realizarse a una frecuencia de 10 Hz y con una intensidad de 0,02-0,003 cd/m²/seg. Esta parte del examen electroretinográfico debe ser realizada después del proceso de adaptación a la oscuridad¹¹².

5.2. Evaluación de la función mixta: conos y bastones

Esta evaluación consiste en la respuesta a un estímulo único de 2-3 $\text{cd/m}^2/\text{s}$ de intensidad realizado al final del proceso de la adaptación a la oscuridad o al flicker¹¹².

5.3. Evaluación de la función de los conos

a) Adaptación a la luz

-La adaptación a la luz debe durar al menos 10 minutos en un ambiente luminoso de luz blanca¹¹².

-La intensidad de la luz ambiental debe situarse entre 30-40 cd/m^2 ¹¹².

b) El estímulo luminoso

-El color recomendado del estímulo luminoso es el uso de luz blanca, aunque el uso de luz cromática está permitido¹¹².

-La intensidad del estímulo debe conseguirse mediante un flash de alta intensidad (2-3 $\text{cd/m}^2/\text{seg.}$) denominado flash estándar (FE). Hay que tener en cuenta que el uso de filtros cromáticos atenúa la intensidad del estímulo¹¹².

-Un único destello debe ser suficiente para evaluar la función de los conos. En el caso de que, al igual que en el caso de la evaluación de bastones, se quiera realizar un promedio de respuestas, el número de estímulos debe superar los 16 y a una frecuencia de 4,9 o 5,1 Hz¹¹².

c) El ERG flicker

La respuesta al flicker en los conos se recomienda que sea evaluada con una frecuencia de 30 Hz con una intensidad de flash estándar^{1,6,21,158,159}.

5.4. Otras indicaciones

-Se recomienda el uso de estimuladores tipo Ganzfeld¹¹².

-La duración de los destellos debe situarse entre 10-20 μseg ; nunca debe sobrepasar los 5 mseg ¹¹².

-Una estimulación bilateral está permitida¹¹².

-El animal no debe haber estado expuesto a una luz fuerte al menos durante una hora¹¹².

-El animal debe ser anestesiado y el protocolo utilizado debe ser especificado y, previamente, debe haberse obtenido valores normales de animales de la misma edad y especie. Durante el examen electrorretinográfico, y más teniendo en cuenta que el animal se encuentra anestesiado, es necesario mantener al animal correctamente oxigenado y ventilado para evitar alteraciones en los valores del ERG¹¹².

-Las pupilas deben encontrarse totalmente dilatadas durante todo el examen electrorretinográfico y los párpados tienen que encontrarse bien abiertos todo el tiempo¹¹².

-Los electrodos corneales en forma de lentes de contacto son los que se recomiendan. Los electrodos de referencia se situarán en la mitad de la línea que une el canto temporal del ojo con el oído, siempre y cuando se encuentre a más de dos centímetros de distancia del electrodo corneal¹¹². El electrodo de masa, o de toma de tierra, se colocará en un punto indiferente; generalmente se utiliza la zona medial más dorsal de la región cefálica²¹.

-La impedancia de los electrodos debe mantenerse por debajo de 5 k Ω ¹¹².

-El equipo de amplificación y filtración debe reunir las medidas de seguridad impuestas por la CE para los aparatos de electrorretinografía utilizados en medicina humana. También debe permitir la amplificación suficiente para poder obtener valores precisos. Se recomienda que los filtros estén situados en un rango entre 1-300 Hz¹¹².

5.5. Informe de resultados

-Debe presentarse la línea basal antes del comienzo del estímulo, así como señalar el comienzo del estímulo. La duración de la respuesta debe ser de al menos 200 mseg¹¹².

-Deben incluirse los valores de¹¹²: Amplitud de la onda **a** y **b**, tiempo de latencia o *implicit time* de la onda **a** y **b** y curva de adaptación a la oscuridad.

-Es conveniente establecer unos valores de referencia de estas características para cada especie evaluada en función de las condiciones de estimulación y de registro de la señal²⁵, por lo que en las publicaciones se debe incluir las gráficas de individuos normales de la misma edad y especie, además de utilizar el mismo protocolo anestésico. Las gráficas tienen que incluir las calibraciones para posibilitar que el lector las pueda interpretar correctamente^{21,112}. Así mismo, se recomienda que en cada lugar donde se realicen electroretinografías tenga sus propios valores de referencia resultantes de la aplicación exacta de un mismo protocolo electroretinográfico^{16,21}.

6. El examen electroretinográfico en los reptiles

En lacértidos de hábitos diurnos se han llevado a cabo estudios electroretinográficos por diferentes autores que se han servido de esta técnica para determinar la sensibilidad espectral de sus retinas³⁻⁵ o de sus propiedades electrofisiológicas^{2,32}. En especial, en la iguana verde, en la bibliografía consultada la mayoría de los estudios electroretinográficos realizados se han basado fundamentalmente en el realizado por Meneghini y Hamasaki en 1967².

6.1. Anestesia y preparación de los animales.

En dicho estudio², los animales fueron anestesiados con tribromoetanol vía oral, y fueron colocados en decúbito esternal en un bloque de madera. Se les aplicó un colirio de clorhidrato de proparacaína y el párpado superior fue reseccionado para exponer la esclerótica conjuntival; además, se suturó el párpado inferior para alejarlo de la pupila, aunque sólo se consiguió una dilatación parcial de la pupila con un máximo de 2-3 mm de diámetro². En otro estudio electroretinográfico posterior las iguanas se anestesiaron con ketamina a una dosis de 40 mg/kg intramuscular³².

6.2. Obtención del ERG.

En el estudio mencionado anteriormente² para la obtención del ERG se utilizó una lámpara de 6V 18A, cuya luz se focalizó en el plano de la pupila². La luminancia fue de 1.3×10^6 ft-L¹⁶⁰. La duración de los estímulos se controló mediante una contraventana de cámara. La intensidad de los estímulos vino dada por la utilización de distintos filtros. Para el estudio de los estímulos intermitentes en la fusión del flicker se utilizó un disco sectorial con un ratio oscuridad/luz de 1:1 movido por un motor. Los electrodos que se usaron para medir los potenciales se insertaron dentro del globo ocular, en la parte media del vítreo. El electrodo indiferente se situó bien en la parte posterior de la órbita, bien en el subcutáneo en la cabeza. Las respuestas fueron amplificadas y mostradas en un osciloscopio, grabándose mediante el uso de un polígrafo tipo Grass. Así mismo, también se estudió el grado de influencia de la hipotermia en los valores electroretinográficos. Para valorar este último apartado, los animales se sometieron a un enfriamiento gradual mediante el recubrimiento con cubitos de hielo y agua fría. Un termómetro colocado en el esófago se usó como indicador de la temperatura corporal de los animales. Una vez terminadas las electroretinografías, se usó una manta eléctrica para devolverlos a su temperatura normal².

6.3. Examen fotópico

Los resultados electroretinográficos realizados en condiciones fotópicas han resultado ser muy similares a aquellos obtenidos en otros lacértidos con retinas compuestas únicamente por conos¹⁶⁰. A una intensidad máxima, alcanzada cuando se llega de 2 a 2.5 unidades logarítmicas por encima del umbral, el ERG muestra una onda **a** negativa y de corta duración seguida por una onda **b** de mayor amplitud y con un tiempo de latencia y de culminación corto, aspectos característicos de retinas compuestas por conos. La curva descendiente de la onda **b** permanece negativa mientras dura el estímulo². También se ha demostrado electroretinográficamente tres subpoblaciones de fotorreceptores tipo cono, cada una de las cuales tiene un pico máximo diferente de sensibilidad espectral: 460-470 nm, 520-540 nm y 600 nm^{4,5}.

6.4. Examen escotópico

En un estudio sobre ERG en iguanas los ERGs realizados en condiciones escotópicas mostraron pocos cambios respecto a los obtenidos en condiciones fotópicas. La curva de adaptación a la oscuridad mostró un descenso suave y no se observó la ruptura entre los bastones y los conos, típica de las retinas que poseen ambos tipos de fotorreceptores. Tras 90 minutos de adaptación a la oscuridad solamente se produjo un incremento total de sensibilidad de una unidad logarítmica. Cabe señalar que la onda **b** obtenida tuvo un ligero incremento de amplitud y tiempo de latencia respecto a la onda **b** fotópica. Todos estos resultados se observan en retinas que poseen únicamente conos².

6.5. Fusión del flicker

El estudio de fusión del flicker se realizó empezando en el animal totalmente adaptado a la oscuridad con la intensidad umbral, para luego ir aumentando la intensidad de 0.5 en 0.5 unidades logarítmicas. Para cada determinación se tardó, aproximadamente, un minuto. En la especie *Iguana iguana* la gráfica obtenida mostraba un incremento lineal sin ningún signo de ruptura en la curva y con una pendiente -20 Hz por cada unidad logarítmica-muy marcada. La ausencia de discontinuidad, las frecuencias altas y la pendiente pronunciada de la curva indican que la retina de la especie *Iguana iguana* es una retina compuesta exclusivamente por conos².

6.6. La electroretinografía en condiciones de hipotermia

La hipotermia produjo una disminución progresiva en las amplitudes y tiempos de culminación de las ondas **a** y **b**, que resultó más evidente al principio. Sin embargo, incluso a temperaturas de 5° C, se obtuvieron ERGs completos².

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Materiales

1.1. Animales

Para la realización del estudio se emplearon 44 iguanas verdes (*Iguana iguana*) adultas de ambos sexos –21 machos y 23 hembras- y clínicamente sanas. Las iguanas procedían del Centro de Recuperación de Fauna Silvestre “El Valle” (CRFSV), y del Servicio de Animales Exóticos y de Oftalmología del Hospital Clínico Veterinario (HCV) de la Universidad de Murcia. El estudio se realizó durante el período comprendido entre los años 2000 y 2005.

1.2. Aparataje y material accesorios

a. Equipo de electroretinografía (Figuras 3 y 4):

-Electroretinógrafo modelo Roland consult (Brandenburgo, Alemania) con el software RETIsystem versión 1.32. El electroretinógrafo consta de un ordenador, con el software específico para la realización de la electroretinografía, conectado a un amplificador, a un pre-amplificador y a un fotoestimulador tipo mini-Ganzfeld (lámpara de xenon de 6V 18^a, con una intensidad sin atenuar de 1.5×10^5 ft-L).

-Dos electrodos comerciales, monopolares, corneales, de tipo lentes de contacto, activos o positivos y con anillo de oro (ERG-jet®, Universo Plastique, Suiza).

-Dos electrodos comerciales, temporales, de piel, de tipo superficial, negativos o de referencia y de plata.

-Un electrodo comercial parietal de piel de tipo superficial, de masa o de toma de tierra y de plata.

-Dos electrodos comerciales monopolares corneales DTL o de hilo conductor, activos o positivos (DTL-Thread 100-510-330, Roland Consult, Brandenburgo, Alemania).

-Posicionadores.

-Barrera física hecha de tela para el estudio escotópico.

b. Colirio de carbómero compuesto de gel de hidroxipropilmetilcelulosa (Lacryvisc®, Alcón Cusí, Barcelona).

c. Biomicroscopio Topcon SL-7F (Japan) con chasis fotográfico y equipo de vídeo.

d. Foco de luz puntual Finoff (Heyne, Germany).

e. Oftalmoscopio directo B200 (Heyne, Germany).

f. Básculas digitales (DIGI. DI-160 y Philips HR 2389/7 Hungría).

g. Calibre de precisión.

h. Regla métrica.

i. Colirio anestésico (Colircusí anestésico doble®, Alcon Cusí, Barcelona).

j. Clorhidrato de medetomidina (Domtor®, Orion Corporation, Espoo, Finlandia) y clorhidrato de ketamina (Imalgene 1000®, Merial, Lyon, Francia).

k. Luxómetro digital (Easy View EA33, Extech Instruments).

1.3. Sala de Exploración

Los exámenes electroretinográficos se realizaron en la sala de oftalmología del HCV. Esta sala se mantuvo a una temperatura ambiente de 29-30°C, es decir, en las condiciones ambientales óptimas descritas para esta especie^{161,162}. Las condiciones lumínicas, medidas con un luxómetro, del ambiente fotópico superaron los 10 cd/m² y del escotópico fueron inferiores a 10⁻³ cd/m² ⁶.

2. Métodos

La metodología de este estudio se desarrolló siempre en horario de mañana^{33,34} y comprendió las siguientes partes:

2.1. Examen físico, hematología y bioquímica sanguínea

Además del examen físico también se realizó a cada animal el día anterior una extracción de una muestra de sangre procedente de la vena coccígea ventral, para realizar una hematología y una bioquímica sanguínea. Los resultados se compararon con los rangos de referencia descritos en la bibliografía consultada para esta especie^{163,164} para confirmar que eran animales clínicamente sanos y, por lo tanto, que eran aptos para ser seleccionados para la realización de la electroretinografía.

2.2. Exploración oftalmológica general

Se realizó una exploración ocular el mismo día de la realización del examen electroretinográfico, según el procedimiento descrito en la bibliografía consultada^{165,166}, con el fin de poder verificar que no existía ninguna patología ocular.

La exploración consistió en:

-Inspección general: una vez la iguana en la Sala de Oftalmología, se evaluó inicialmente el comportamiento y la actitud general, así como el estado de alerta visual.

-Exploración de párpados y segmento anterior (córnea, cámara anterior, iris y cristalino) del globo ocular: la exploración de los párpados y del segmento anterior se efectuó mediante un foco de luz puntual, oftalmoscopio directo (con una lente de +25D ó +40D) y biomicroscopio con el fin de obtener una buena amplificación de las estructuras oculares en las especies de pequeño tamaño. Los animales se mantuvieron en posición horizontal sujetados por un ayudante habituado al manejo de estos reptiles.

-Valoración de los reflejos:

-Reflejo palpebral: se dieron pequeños toques con un bastoncillo de algodón en el canto lateral y medial del párpado. Se consideró normal el que la membrana nictitante atravesara la córnea de forma rápida y completa.

-Reflejo directo: se utilizó un foco de luz brillante en un ambiente con moderada iluminación. Se consideró normal cuando se observó una ligera miosis. A veces se pueden provocar pequeñas respuestas consensuales debido a la estimulación de la retina del ojo contralateral. Hay que tener en cuenta que este reflejo es muy variable debido a que en reptiles y aves la musculatura principal del iris es voluntaria¹⁶⁷.

-Reflejo de amenaza: es inconsistente en reptiles con evidencia de comportamiento visual normal debido también a la musculatura de tipo voluntario del iris y porque los movimientos conjugados de los ojos son mínimos debido a su reducida motilidad ocular.

-Reflejo corneal: Se comprobó tocando con un bastoncillo de algodón la superficie corneal. Aunque no se utiliza de forma rutinaria en la exploración oftalmológica en reptiles, está presente mediante el parpadeo, el movimiento de la membrana nictitante y el comportamiento de aversión hacia los estímulos externos.

2.3. Obtención de las medidas biométricas: peso y longitud narina-cloaca

En primer lugar se efectuaron las medidas de peso y de la longitud narina-cloaca (LNC) de cada una de las iguanas con la colaboración de un ayudante:

-Peso: con el fin de evitar el estrés, las iguanas se introdujeron en una caja de cartón cerrada, que posteriormente se colocó directamente sobre la báscula previamente tarada con el peso de la caja.

-LNC: mediante sujeción manual, un ayudante midió la longitud desde el extremo anterior de la narina hasta la apertura cloacal, bien con un calibre de precisión, bien con una regla métrica.

2.4. Examen electroretinográfico

2.4.1. Preparación de los animales

El examen electroretinográfico empleado está adaptado del protocolo descrito para el perro²¹.

En primer lugar, se eligió un protocolo de anestesia general adecuado para iguanas que evitara el estrés del manejo y que permitiera obtener la inmovilización necesaria para asegurar una correcta realización del examen electroretinográfico.

El protocolo de anestesia general que se aplicó fue el siguiente: clorhidrato de ketamina (Imalgene®), a una dosis de 10 mg/kg, y clorhidrato de medetomidina (Domtor®), a la dosis de 100 µg/kg¹⁶⁸. Esta combinación de anestesia general utilizada en perros^{24,169} se mezcló en la misma jeringuilla y se inyectó vía intramuscular en un miembro anterior. La inducción tardó una media de veinte minutos. Una vez inducido, se colocó en decúbito esternal.

Entonces se procedió a la colocación de los electrodos. Primero se colocaron los electrodos corneales tipo ERG-jet (Figuras 3 y 4). En el caso de la iguana, cuyo peso era de 59 gramos, se utilizaron los electrodos corneales del tipo hilo conductor en vez de las lentes de contacto.

En seis animales -cada uno con un peso inferior a 350 gramos- hubo que adaptar los electrodos corneales debido a que el diámetro de la fisura palpebral fue muy pequeño. La adaptación en estos casos consistió en reducir la superficie original de contacto del electrodo corneal. Se aplicó el colirio de carbómero entre los electrodos y la córnea para asegurar una buena transmisión eléctrica y para mantener la córnea hidratada. Después se colocaron los electrodos temporales y el electrodo parietal usando pasta conductora de ERG, que a la vez sirvió de sujeción de los mismos. Los electrodos temporales de referencia se situaron caudalmente al canto temporal del ojo. El electrodo parietal de masa se colocó justo encima del ojo parietal de la iguana (Figuras 3 y 4). Los electrodos se conectaron a los canales del amplificador. La correcta colocación y contacto corneal se confirmó comprobando que el nivel de impedancia de los electrodos era el correcto, es decir, inferior a 5 kΩ³².

2.4.2. Obtención de los electroretinogramas

En primer lugar se preestableció el amplificador del electroretinógrafo con un ancho de banda de 5-50 Hz. El fotoestimulador utilizado fue tipo mini-Ganzfeld. Tanto el amplificador como el fotoestimulador se conectaron al electroretinógrafo.

Cada estimulación se realizó primero en el ojo derecho y, a continuación, en el ojo izquierdo²⁴. Una vez obtenido el registro electroretinográfico, se procedió a las medidas de las amplitudes y los tiempos de latencia de las ondas **a** y **b**.

2.4.3. Evaluación fotópica

En primer lugar se procedió a la evaluación fotópica mediante el test tipo flicker. Se utilizó un fotoestimulador con una lámpara de xenón de 6V y 18A acromático. La intensidad del estímulo fue de 2-3 cd/m²/seg. La duración del destello fue de 10 μseg. y la frecuencia utilizada fue de 30 Hz¹¹².

Después de realizar el flicker, se continuó la evaluación fotópica, pero utilizando una estimulación de tipo flash con un promedio de 8 destellos a una frecuencia de 4.9 Hz¹¹².

2.4.4. Evaluación escotópica

En primer lugar se colocó, para mejorar las condiciones escotópicas, la barrera física entre la iguana y la pantalla del electroretinógrafo, y se empezó con la evaluación escotópica mediante un flash acromático de baja intensidad (0,025 cd/m²/seg.) y de 10 μseg. de duración de destello, siempre promediados como indica el protocolo de la E.C.V.O y la E.S.V.O¹¹² para el perro (4 destellos a una frecuencia de 0.5 Hz) y fue entonces cuando se empezó la evaluación escotópica. Se realizó un estímulo cada 5 minutos hasta llegar a los 30 minutos.

2.5. Estudio estadístico

El procesado de los datos y los análisis estadísticos se realizaron con el programa estadístico SPSS 13.0.1 para Windows (SPSS Inc, Chicago, Illinois, USA).

Se obtuvieron estadísticos descriptivos (media, desviación estándar, máximos y mínimos) para las variables biométricas (peso y LNC), así como para las variables electrorretinográficas (voltaje y duración de las ondas **a** y **b**). Dichos valores fueron calculados, según el caso, tanto referidos al total de la muestra como en función del sexo, ojo explorado (derecho o izquierdo), tipo de estímulo (flicker, fotópico o escotópico) y duración del estímulo escotópico (5, 10, 15, 20, 25 ó 30 segundos).

Las variables cuantitativas (peso, LNC, voltaje y duración de las ondas **a** y **b**) fueron exploradas para determinar si seguían una distribución normal mediante los tests de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk¹⁷⁰. En las variables electrorretinográficas con distribución normal, la posible influencia del sexo, ojo explorado, tipo de estímulo y duración del estímulo escotópico fue estudiada mediante análisis de varianza (ANOVA)¹⁷⁰. Tras este análisis, con las variables que mostraron diferencias estadísticamente significativas, se realizaron comparaciones por parejas mediante el test de Bonferroni para precisar el origen de dichas diferencias¹⁷⁰. Las variables electrorretinográficas con distribución no normal fueron estudiadas mediante el test de Kruskal-Wallis, para evaluar la influencia del sexo, ojo explorado, tipo de estímulo y duración del estímulo escotópico¹⁷⁰.

Tras este análisis, con las variables que mostraron diferencias estadísticamente significativas, se realizaron comparaciones por parejas mediante el test de Mann-Whitney para precisar el origen de dichas diferencias¹⁷⁰.

La posible influencia del peso y la longitud narina cloana en las variables electrorretinográficas se estudió mediante el análisis de correlación de Spearman (no paramétrico) y el análisis de correlación de Pearson

(paramétrico), considerando tanto la muestra completa como seleccionando en función del tipo de estímulo. Posteriormente, en los casos en los que se detectaron correlaciones significativas, se realizó un análisis de regresión lineal para caracterizar mejor la relación entre las variables correlacionadas, obteniendo los gráficos de dispersión y las ecuaciones de las rectas de regresión¹⁷⁰.

Los resultados fueron considerados estadísticamente significativos si $P < 0.05$. En todos los casos, cuando los resultados de las pruebas no paramétricas coincidían con los de las pruebas paramétricas, se adoptaron los resultados de significación estadística aportados por las pruebas paramétricas¹⁷⁰.

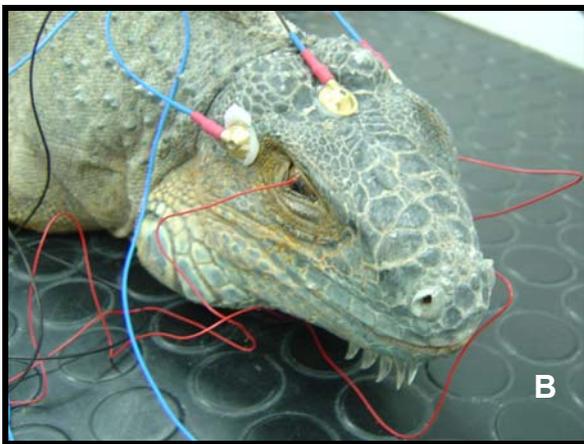
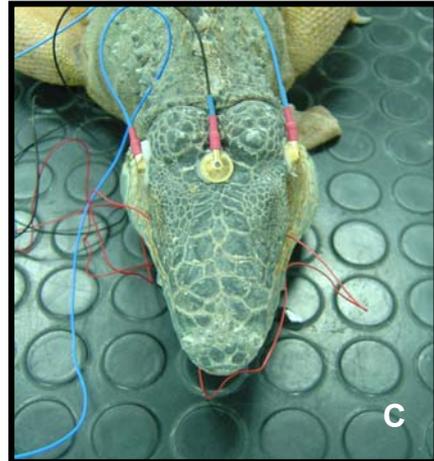
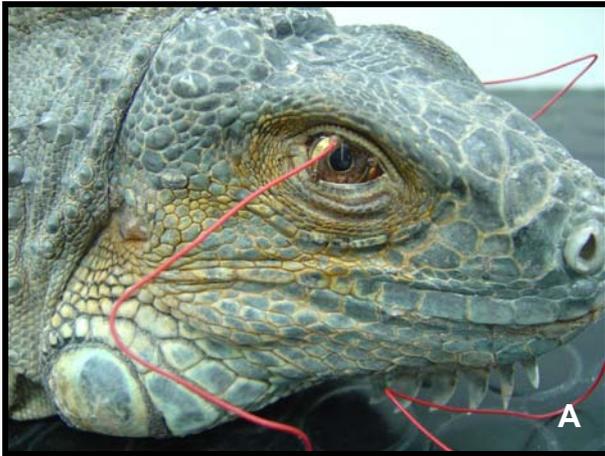


Figura 3:

A. Aspecto y posición, desde una perspectiva lateral derecha, de un electrodo corneal tipo lentilla y actuación como blefarostato en una iguana verde perteneciente al estudio.

B. Aspecto y posición, desde una perspectiva dorsolateral derecha, del electrodo corneal derecho, de los electrodos temporales y del electrodo parietal en una iguana verde.

C. Aspecto y posición, desde una perspectiva dorsal, de los electrodos corneales, temporales y parietal en una iguana verde.

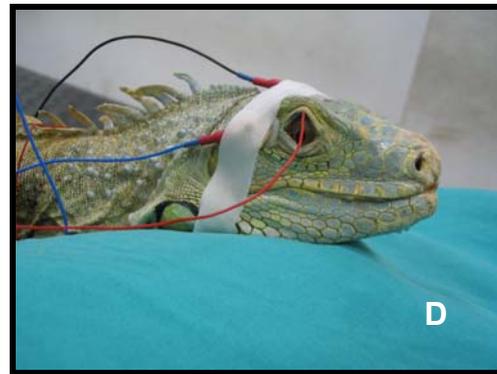
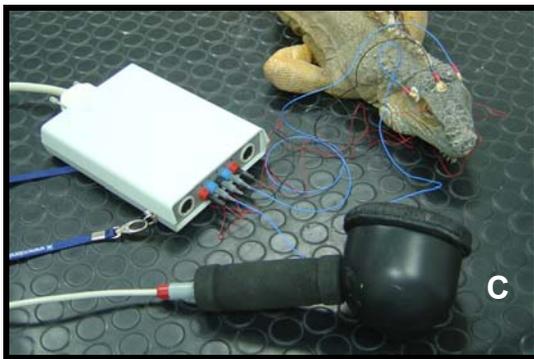
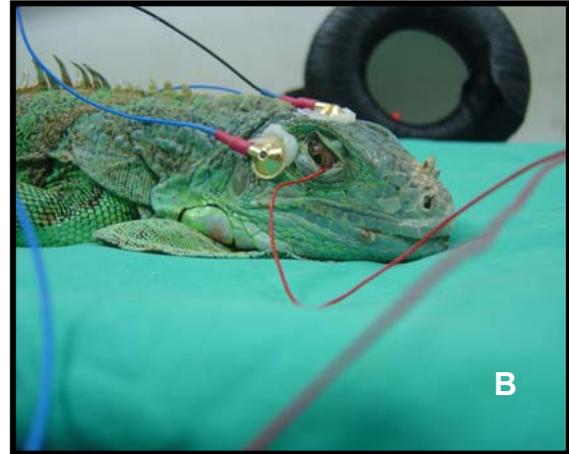
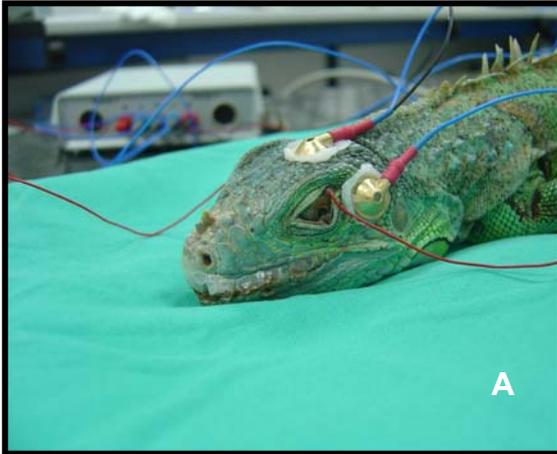


Figura 4:

A. Amplificador, aspecto y posición, desde una perspectiva lateral izquierda, del electrodo corneal izquierdo (ERG-jet), temporal izquierdo y parietal.

B. Fotoestimulador tipo mini-Ganzfeld y aspecto y posición, desde una perspectiva lateral derecha, del electrodo corneal derecho (ERG-jet), temporal derecho y parietal.

C. Amplificador, fotoestimulador tipo mini-Ganzfeld, aspecto y posición, desde una perspectiva dorsal, de los electrodos corneales (ERG-jet), temporales y parietal.

D. Aspecto, posición y fijación, desde una perspectiva lateral derecha, del electrodo corneal derecho (ERG-jet), temporal derecho y parietal.

RESULTADOS

1. Biometría

El rango del peso de los distintos animales utilizados en este estudio varió entre 59 y 3300 gramos, con un valor medio de 1034 ± 799 gramos. En cuanto a la LNC el rango fue entre 120 y 420 mm. con un valor medio de 294 ± 69 mm.

2. Preparación de las iguanas

La inducción neuroleptoanalgésica mediante la inyección de la combinación de ketamina y medetomidina se completó a los veinticinco minutos y mantuvo a los animales en un plano anestésico cualitativamente adecuado para la realización del examen electrorretinográfico completo. La colocación de los electrodos resultó sencilla y breve: se invirtió una media de cinco minutos por animal. La actuación de los electrodos como blefarostato resultó satisfactoria en el 100% de los animales.

3. Examen electrorretinográfico

3.1. Análisis cualitativo

El examen electrorretinográfico realizado permitió la obtención de ERGs de buena calidad y repetitivos inmediatamente después de la estimulación con el flash. En los ERGs obtenidos se pudieron identificar claramente las ondas **a** y **b**. Ambas ondas mostraron una morfología con pendientes suaves y bases amplias, tanto en el estudio fotópico como en el escotópico (Figura 5). En cambio, las ondas obtenidas tras un estímulo tipo flicker presentaron un dibujo claramente diferente, con pendientes más marcadas y bases más estrechas (Figura 5).

En una de las iguanas, de reducido tamaño, en la que se sustituyeron las lentes por hilo conductor, se obtuvieron también con facilidad las mismas ondas que en las que se utilizaron las lentes.

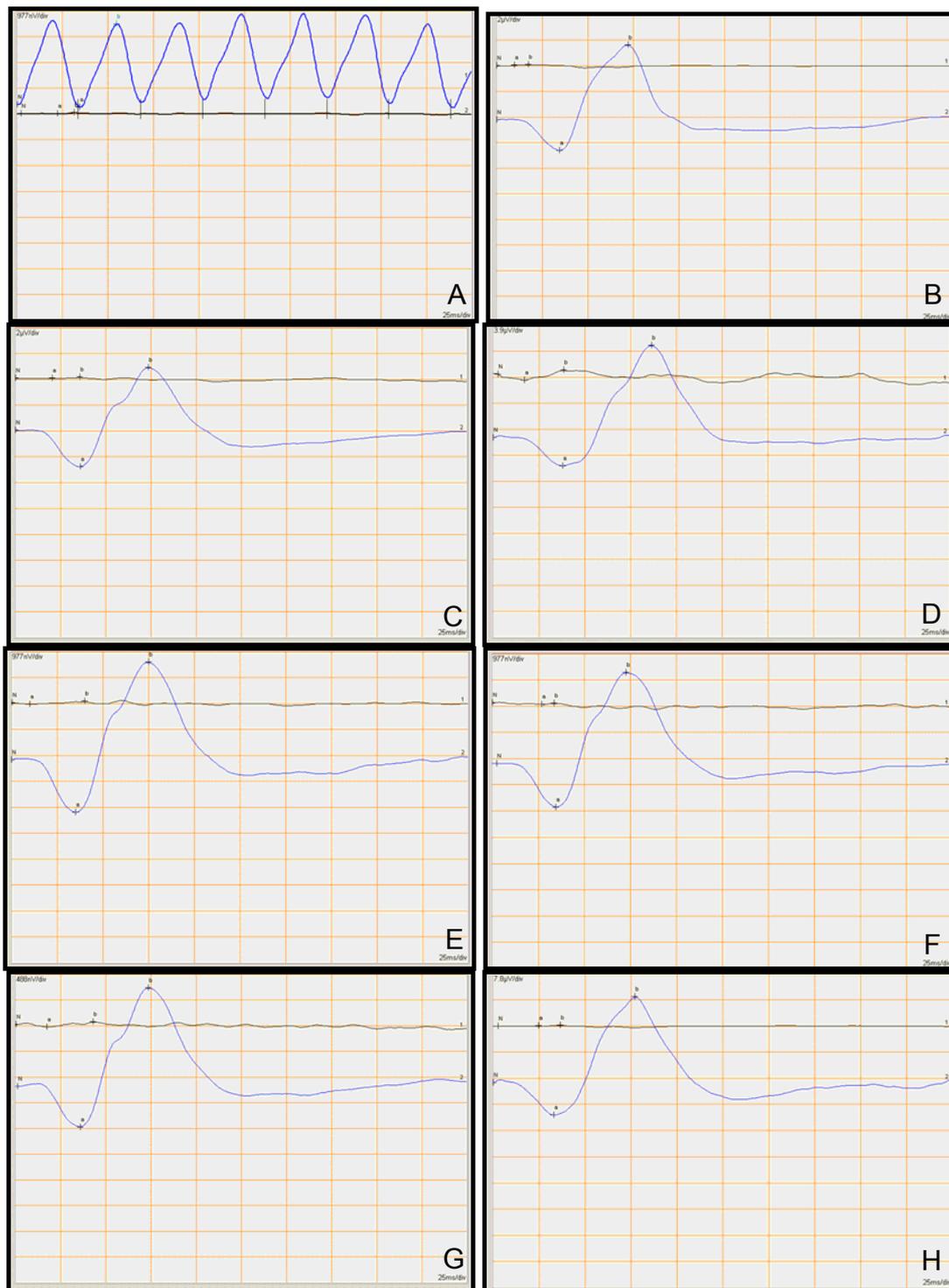


Figura 5. Electroretinogramas obtenidos en una iguana verde (Iguana iguana). A, estímulo tipo flicker; B, estímulo fotópico; C, estímulo escotópico a los 5 minutos; D, estímulo escotópico a los 10 minutos; E, estímulo escotópico a los 15 minutos; F, estímulo escotópico a los 20 minutos; G, estímulo escotópico a los 25 minutos; H, estímulo escotópico a los 30 minutos.

3.2. Análisis cuantitativo

Los valores descriptivos correspondientes a los diferentes parámetros electroretinográficos tras los diferentes estímulos se muestran en las tablas 1 y 2 y son gráficamente representados en los diagramas de caja (box-plots) incluidos en la figura 6.

3.2.1. Influencia del peso y de la longitud narina cloaca

Ambas variables biométricas no mostraron correlación significativa con el tiempo de latencia y/o la amplitud de ninguna de las ondas electroretinográficas obtenidas tras un estímulo tipo flicker o fotópico (Tabla 3). En cambio, la amplitud de la onda **a** (av) mostró una correlación positiva estadísticamente significativa con el peso y la LNC para todos los estímulos escotópicos (Tabla 3). No obstante, como se aprecia en los gráficos de dispersión obtenidos tras el análisis de regresión lineal (Figuras 7 y 8), la relación entre dichas variables (av con peso y LNC) es débil, con pendientes suaves y valores de R-cuadrado de entre 0.06 y 0.13.

El análisis de correlación mostró, además, una correlación positiva estadísticamente significativa entre la amplitud de la onda **b** y el peso y la LNC para los estímulos escotópicos a los cinco y diez minutos (Tabla 3). Al igual que para el caso de la variable av, en este caso el posterior análisis de regresión lineal indica que la relación entre la variable bv con el peso y la LNC es débil, con pendientes cercanas a cero y valores de R-cuadrado de entre 0.01 y 0.03 (Figura 9).

3.2.2. Influencia del sexo

En la tabla 4 se exponen los valores medios y desviaciones estándar obtenidos en machos y hembras para cada variable electroretinográfica tras los diferentes estímulos. Dichos valores aparecen gráficamente representados en las figuras 10 a 13. En ambos casos se aprecian escasas diferencias entre los valores obtenidos en machos y hembras. De hecho, los test estadísticos empleados para evaluar la influencia del sexo en las variables electroretinográficas (ANOVA, Kruskal-Wallis) no hallaron diferencias estadísticamente significativas independientemente del tipo de estímulo

utilizado y estado de adaptación de la retina. En base a ello, los valores correspondientes a los individuos de ambos sexos fueron agrupados para la realización del resto del estudio estadístico.

3.2.3. Comparación entre ojo derecho y ojo izquierdo

En la tabla 5 se exponen los valores medios y desviaciones estándar obtenidos en sendos ojos para cada variable electroretinográfica tras los diferentes estímulos. Dichos valores aparecen gráficamente representados en las figuras 14 a 17. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el ojo derecho y el izquierdo para la amplitud y el tiempo de latencia de las ondas electroretinográficas (**a** y **b**) independientemente del tipo de estímulo utilizado y estado de adaptación de la retina. En base a ello, los valores correspondientes a ambos ojos de las diferentes iguanas fueron agrupados para la realización del resto del estudio estadístico.

3.2.4. Influencia del tipo de estímulo

Al comparar de forma conjunta los valores medios obtenidos para las ondas electroretinográficas generadas por los diferentes estímulos realizados se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas. Para precisar el origen de dichas diferencias se realizaron comparaciones pareadas entre los diferentes tipos de estímulo. Los valores medios obtenidos para la amplitud y tiempo de latencia de las ondas electroretinográficas **a** y **b** tras el estímulo tipo flicker resultaron significativamente diferentes a los obtenidos tras el estímulo fotópico así como para cada uno de los escotópicos (Tablas 1 y 2, Figuras 18 a 21). En cambio, los valores medios de las ondas electroretinográficas obtenidos tras el estímulo fotópico no resultaron significativamente diferentes de los obtenidos tras los estímulos escotópicos (Tablas 1 y 2, Figuras 18 a 21). Así mismo, los valores obtenidos entre los distintos estímulos escotópicos no resultaron estadísticamente diferentes entre sí (Tablas 1 y 2, Figuras 18 a 21). Estos datos sugieren que en las ondas electroretinográficas influyó de manera significativa solamente el tipo de frecuencia empleado en el estímulo (30 Hz para el estímulo tipo flicker o 4,1 Hz para el resto), y no el estado de adaptación de la retina.

3.2.5. Relación entre los parámetros electroretinográficos

En las tablas 6 a 13 se exponen los resultados de los análisis de correlación realizados para contrastar entre sí los diferentes parámetros electroretinográficos obtenidos tras los diferentes estímulos. Se encontró correlación positiva estadísticamente significativa ($P < 0.01$) entre los valores de av y bv independientemente del estímulo utilizado. También se encontró correlación positiva estadísticamente significativa ($P < 0.01$) entre los valores de at y bt independientemente del estímulo utilizado.

Al evaluar el resto de los contrastes, se aprecia una correlación negativa entre el voltaje y la duración de la onda **a** y el voltaje y la duración de la onda **b**. Es decir, a mayor voltaje de la onda (tanto **a** como **b**), menor duración de la misma. Como se aprecia en las tablas 6 a 13, dicha correlación negativa tiempo-voltaje resultó estadísticamente significativa para la onda **a** obtenida tras estímulo flicker y escotópico a los 15, 20 y 25 minutos. En el caso de la onda **b**, la correlación fue significativa tras estímulo fotópico y escotópico a los 5, 10, 15, 20 y 25 minutos.

3.2.6. Relación entre onda a y onda b para los diferentes estímulos

Para estudiar la relación existente entre las dos ondas electroretinográficas dentro del mismo trazado electroretinográfico, se calcularon los ratios bt/at y bv/av para cada tipo de estímulo. Los estadísticos descriptivos correspondientes a dichos ratios se muestran en las tablas 1 y 2. En las tablas 14 y 15 se muestran los resultados del análisis de Mann-Whitney realizado para comparar los valores correspondientes a los ratios bt/at y bv/av entre los diferentes tipos de estímulo. Como puede apreciarse en dichas tablas, existen diferencias estadísticamente significativas para ambos ratios obtenidos tras estímulo flicker con los obtenidos tras el resto de los estímulos. Para el caso del ratio bt/at , indicativo de la relación entre los tiempos de latencia de las ondas electroretinográficas, el valor medio obtenido tras estímulo flicker es significativamente menor que el obtenido tras el resto de los estímulos (Tablas 1, 2 y 14). Para el caso del ratio entre voltajes (bv/av), el valor medio obtenido tras estímulo flicker es significativamente mayor que el obtenido tras el resto de

los estímulos (Tablas 1, 2 y 15). Para el ratio bv/av , no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el resto de estímulos. En cambio, para el ratio bt/at , además de las mencionadas, se detectaron valores significativamente menores entre los valores de bt/at obtenidos tras estímulo fotópico y los obtenidos tras estímulo escotópico a los 10, 15, 20 y 25 minutos (Tablas 1, 2 y 14).

Tabla 1. Estadísticos descriptivos correspondientes a los diferentes parámetros electroretinográficos obtenidos tras estimulación flicker, fotópico y escotópico 5 y 10 minutos.

Estímulo		at (mseg)	av (μ v)	bt (mseg)	bv (μ v)	bt/at	bv/av
Flicker	Media	29,56*	2,65*	48,92*	12,52*	1,74	41,10
	N	87	87	87	87	87	87
	IC lím sup.	27,92	1,87	46,95	10,47	1,64	-6,18
	IC lím. inf.	31,20	3,42	50,89	14,56	1,84	88,38
	Desv. típ.	7,70	3,64	9,25	9,59	,46	221,83
	Mediana	30,00	1,51	50,00	11,40	1,67	6,37
	Error típ.	,82	,39	,99	1,03	,049	23,78
	Mínimo	4,00	,01	17,00	,52	1,23	1,04
	Máximo	46,00	24,80	67,67	40,40	5,00	2033,33
Rango	42,00	24,79	50,67	39,88	3,77	2032,29	
Fotópico	Media	32,51	6,40	65,54	25,52	2,04	6,46
	N	87	87	87	87	87	87
	IC lím sup.	31,26	5,39	63,31	22,14	1,98	4,72
	IC lím. inf.	33,76	7,40	67,76	28,89	2,10	8,19
	Desv. típ.	5,86	4,70	10,44	15,84	,29	8,13
	Mediana	32,00	5,49	64,00	22,30	2,00	3,77
	Error típ.	,63	,50	1,12	1,70	,03	,87
	Mínimo	18,00	,03	46,00	,61	1,68	1,53
	Máximo	43,00	23,40	88,00	69,80	3,72	49,30
Rango	25,00	23,37	42,00	69,20	2,05	47,77	
Escotópico 5 min	Media	33,32	6,06	68,00	25,34	2,05	8,20
	N	87	87	87	87	87	87
	IC lím sup.	32,20	5,14	65,67	22,43	2,00	5,11
	IC lím. inf.	34,45	6,99	70,33	28,24	2,11	11,28
	Desv. típ.	5,28	4,34	10,95	13,65	,25	14,50
	Mediana	33,00	5,01	66,00	23,00	2,07	3,90
	Error típ.	,57	,46	1,17	1,46	,03	1,55
	Mínimo	21,00	,10	44,00	1,00	1,47	2,05
	Máximo	47,00	19,10	93,00	70,10	3,29	93,20
Rango	26,00	19,00	49,00	69,10	1,82	91,16	
Escotópico 10 min	Media	32,98	6,34	67,99	26,19	2,07	13,08
	N	87	87	87	87	87	87
	IC lím sup.	31,78	5,39	65,56	23,08	2,03	4,50
	IC lím. inf.	34,18	7,29	70,42	29,30	2,12	21,66
	Desv. típ.	5,63	4,46	11,40	14,60	,23	40,26
	Mediana	31,00	5,22	65,00	26,00	2,07	4,06
	Error típ.	,60	,48	1,22	1,56	,02	4,32
	Mínimo	21,00	,03	43,00	1,60	1,23	,86
	Máximo	48,00	20,10	96,00	68,00	2,74	288,04
Rango	27,00	20,07	53,00	66,40	1,51	287,18	

at, tiempo de latencia onda **a**; bt, tiempo de latencia onda **b**; av, amplitud de la onda **a**; bv, amplitud de la onda **b**. * Diferencias estadísticamente significativas con el resto de estímulos.

Tabla 2. Estadísticos descriptivos correspondientes a los diferentes parámetros electroretinográficos obtenidos tras estimulación escotópica a los 15, 20, 25 y 30 minutos.

Estímulo		at (mseg)	av (μ v)	bt (mseg)	bv (μ v)	bt/a	bv/av
Escotópico 15 min	Media	32,62	6,60	68,60	28,65	2,12	6,01
	N	80	80	80	80	80	80
	IC lím sup.	31,30	5,66	66,09	25,40	2,06	4,58
	IC lím. inf.	33,95	7,55	71,11	31,90	2,19	7,44
	Desv. típ.	5,96	4,24	11,26	14,59	,29	6,44
	Mediana	31,50	5,68	65,00	29,00	2,10	4,28
	Error típico	,67	,47	1,26	1,63	,03	,72
	Mínimo	21,00	,16	49,00	2,17	1,50	2,16
	Máximo	58,00	18,90	95,00	66,50	3,52	51,88
Rango	37,00	18,73	46,00	64,33	2,02	49,72	
Escotópico 20 min	Media	32,97	7,24	68,81	30,00	2,11	10,12
	N	80	80	80	80	80	80
	IC lím sup.	31,54	5,98	66,21	26,02	2,05	2,79
	IC lím. inf.	34,41	8,50	71,41	33,98	2,17	17,45
	Desv. típ.	6,46	5,65	11,68	17,88	,28	32,93
	Mediana	32,00	5,47	65,00	27,95	2,07	3,96
	Error típ	,72	,63	1,31	2,00	,03	3,68
	Mínimo	18,00	,10	49,00	3,07	1,48	2,19
	Máximo	62,00	25,40	96,00	92,00	3,69	285,58
Rango	44,00	25,30	47,00	88,93	2,21	283,38	
Escotópico 25 min	Media	32,38	7,43	67,55	31,03	2,09	12,4993
	N	73	73	73	73	73	73
	IC lím sup.	31,19	6,15	64,93	26,96	2,04	3,96
	IC lím. inf.	33,58	8,71	70,17	35,10	2,14	21,03
	Desv. típ.	5,11	5,48	11,23	17,44	,21	36,58
	Mediana	31,00	6,32	65,00	30,50	2,08	4,07
	Error típ	,60	,64	1,31	2,04	,02	4,28
	Mínimo	21,00	,06	39,00	2,64	1,30	2,05
	Máximo	45,00	24,50	87,00	86,00	2,67	224,59
Rango	24,00	24,44	48,00	83,36	1,37	222,54	
Escotópico 30 min	Media	31,33	7,43	64,23	29,90	2,05	5,75
	N	66	66	66	66	66	66
	IC lím sup.	30,07	5,97	60,86	25,36	1,97	4,43
	IC lím. inf.	32,59	8,88	67,60	34,42	2,12	7,07
	Desv. típ.	5,12	5,92	13,71	18,42	,315	5,38
	Mediana	30,00	5,60	63,00	27,85	2,05	3,89
	Error típ	,63	,73	1,69	2,27	,04	,66
	Mínimo	20,00	,59	14,00	3,88	,58	1,69
	Máximo	45,00	26,00	88,00	95,80	2,83	31,01
Rango	25,00	25,41	74,00	91,92	2,25	29,31	

at: tiempo de latencia onda **a**; bt: tiempo de latencia onda **b**; av: amplitud de la onda **a**;
bv: amplitud de la onda **b**.

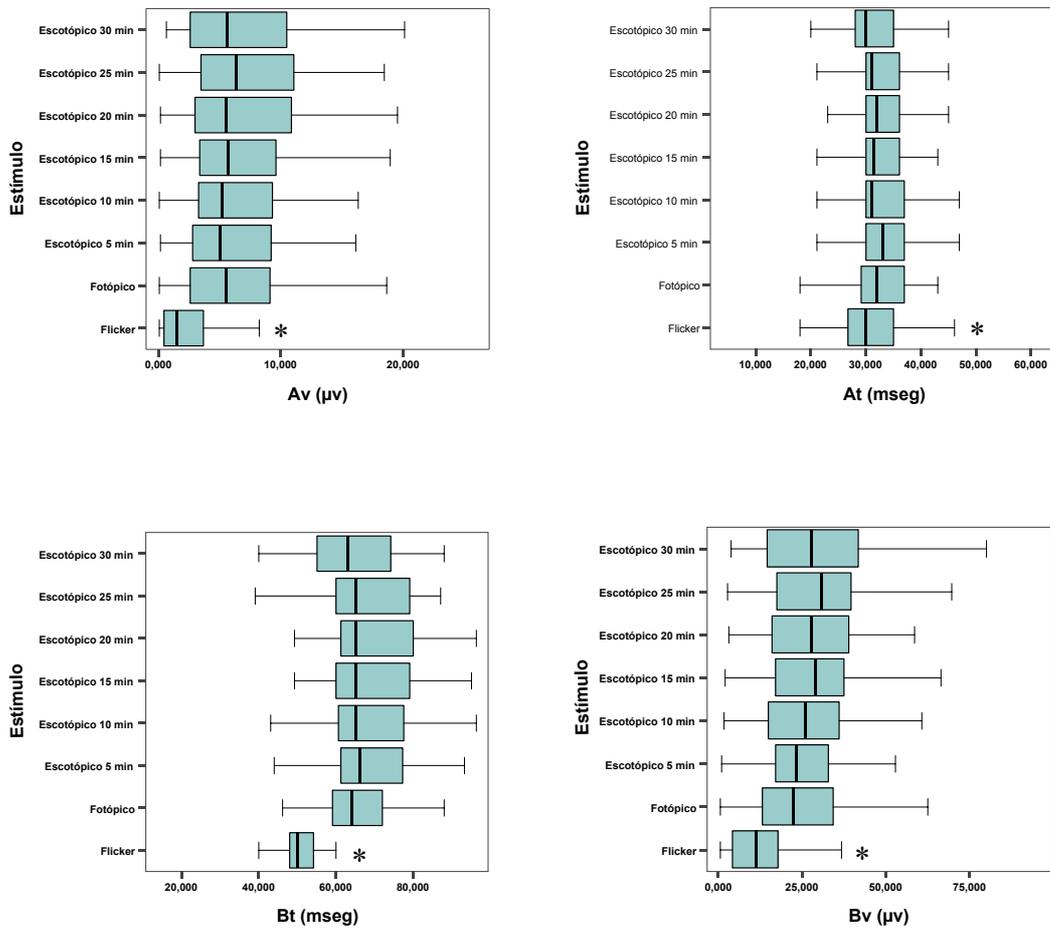


Figura 6. Diagramas de caja (box-plot) mostrando los valores estadísticos descriptivos correspondientes a las variables electroretinográficas: at (ms), av (μ V), bt (ms) y bv (μ V) obtenidos tras los diferentes tipos de estimulación. La línea negra representa la mediana, la caja presenta la línea superior al tercer cuartil, la línea inferior al primer cuartil y los bigotes son las prolongaciones de la caja que terminan en el valor absoluto que sea igual o inferior al tercer o primer cuartil más 1,5 veces el rango intercuartílico. * Diferencias estadísticamente significativas con el resto de estímulos ($p < 0.05$).

Tabla 3. Coeficientes de correlación de Spearman y niveles de significación obtenidos entre las variables biométricas (peso y longitud narina-cloaca) y las variables electroretinográficas (at, bt, av y bv) obtenidas tras los diferentes estímulos.

Rho de Spearman		flicker	fotópico	esc. 5	esc. 10	esc. 15	esc. 20	esc. 25	esc. 30	
at	Peso	Coef.	-,128	-,017	-,160	,041	-,119	-,041	,040	-,143
		Sig.	,238	,878	,140	,708	,292	,716	,738	,253
		N	87	87	87	87	80	80	73	66
	Longitud Narina-Cloaca	Coef.	-,007	,045	-,108	,119	-,073	,016	,064	-,095
		Sig.	,951	,678	,321	,272	,518	,888	,591	,447
		N	87	87	87	87	80	80	73	66
av	Peso	Coef.	-,039	,183	,334**	,406**	,409**	,400**	,432**	,329**
		Sig.	,720	,089	,002	,000	,000	,000	,000	,007
		N	87	87	87	87	80	80	73	66
	Longitud Narina-Cloaca	Coef.	-,116	,180	,338**	,401**	,367**	,379**	,395**	,320**
		Sig.	,284	,095	,001	,000	,001	,001	,001	,009
		N	87	87	87	87	80	80	73	66
bt	Peso	Coef.	,044	,082	,036	,085	,037	,064	,192	-,186
		Sig.	,686	,451	,741	,432	,747	,571	,103	,135
		N	87	87	87	87	80	80	73	66
	Longitud Narina-Cloaca	Coef.	,141	,158	,136	,160	,094	,117	,230	-,133
		Sig.	,193	,144	,207	,139	,406	,303	,051	,287
		N	87	87	87	87	80	80	73	66
bv	Peso	Coef.	,040	,040	,239*	,227*	,200	,204	,199	,235
		Sig.	,712	,715	,026	,034	,076	,070	,092	,057
		N	87	87	87	87	80	80	73	66
	Longitud Narina-Cloaca	Coef.	-,020	,027	,225*	,192	,129	,136	,137	,188
		Sig.	,856	,802	,036	,075	,253	,229	,248	,130
		N	87	87	87	87	80	80	73	66

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

* La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

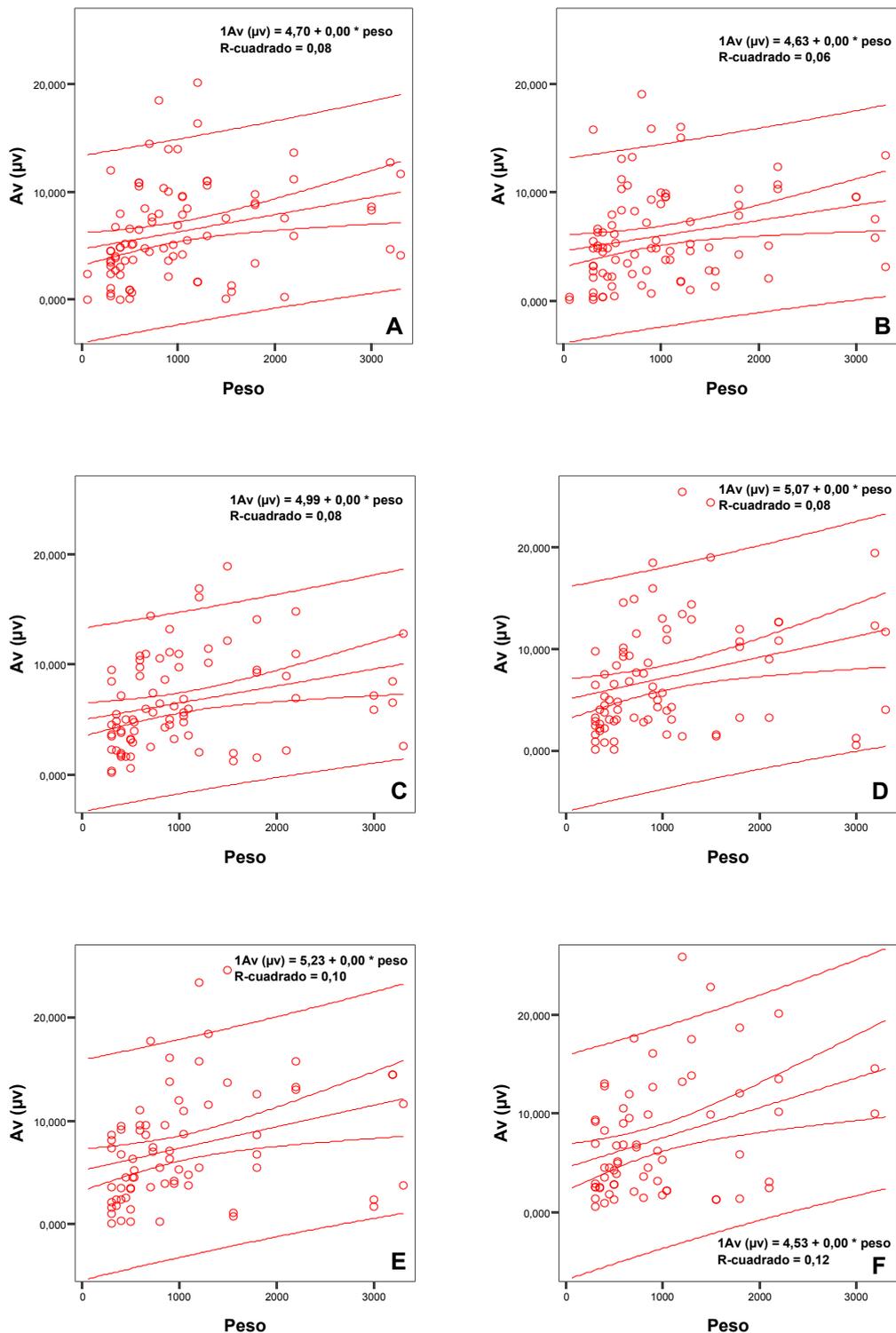


Figura 7. Gráficos de dispersión para la amplitud de la onda **a** y el peso donde existe correlación positiva estadísticamente significativa. **A.** Estímulo escotópico realizado a los cinco minutos. **B.** Estímulo escotópico realizado a los diez minutos. **C.** Estímulo escotópico realizado a los quince minutos. **D.** Estímulo escotópico realizado a los veinte minutos. **E.** Estímulo escotópico realizado a los veinticinco minutos. **F.** Estímulo escotópico realizado a los treinta minutos.

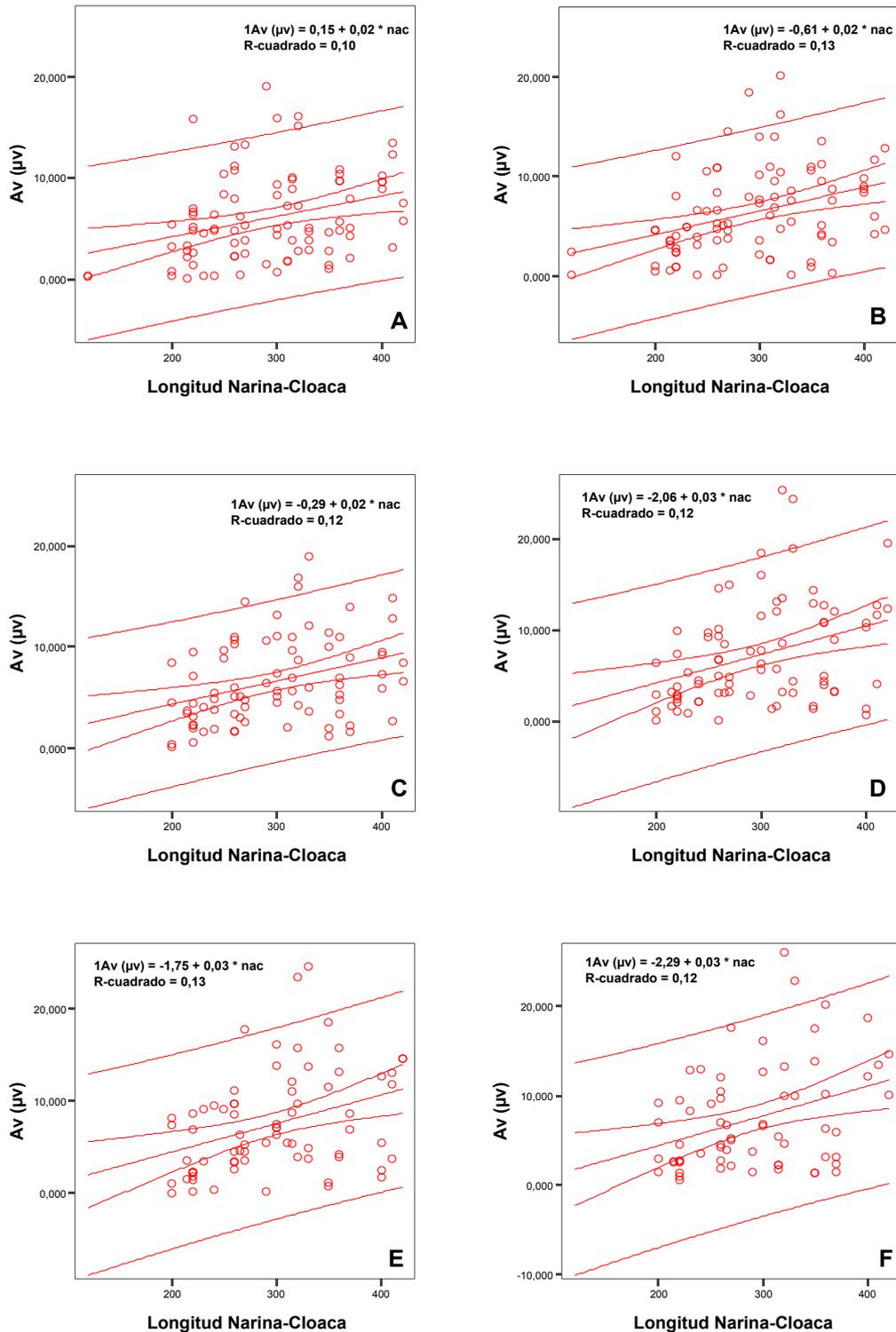


Figura 8. Gráficos de dispersión para la amplitud de la onda a y la longitud narina-cloaca (LNC) donde existe correlación positiva estadísticamente significativa. **A.** Estímulo escotópico realizado a los cinco minutos. **B.** Estímulo escotópico realizado a los diez minutos. **C.** Estímulo escotópico realizado a los quince minutos. **D.** Estímulo escotópico realizado a los veinte minutos. **E.** Estímulo escotópico realizado a los veinticinco minutos. **F.** Estímulo escotópico realizado a los treinta minutos.

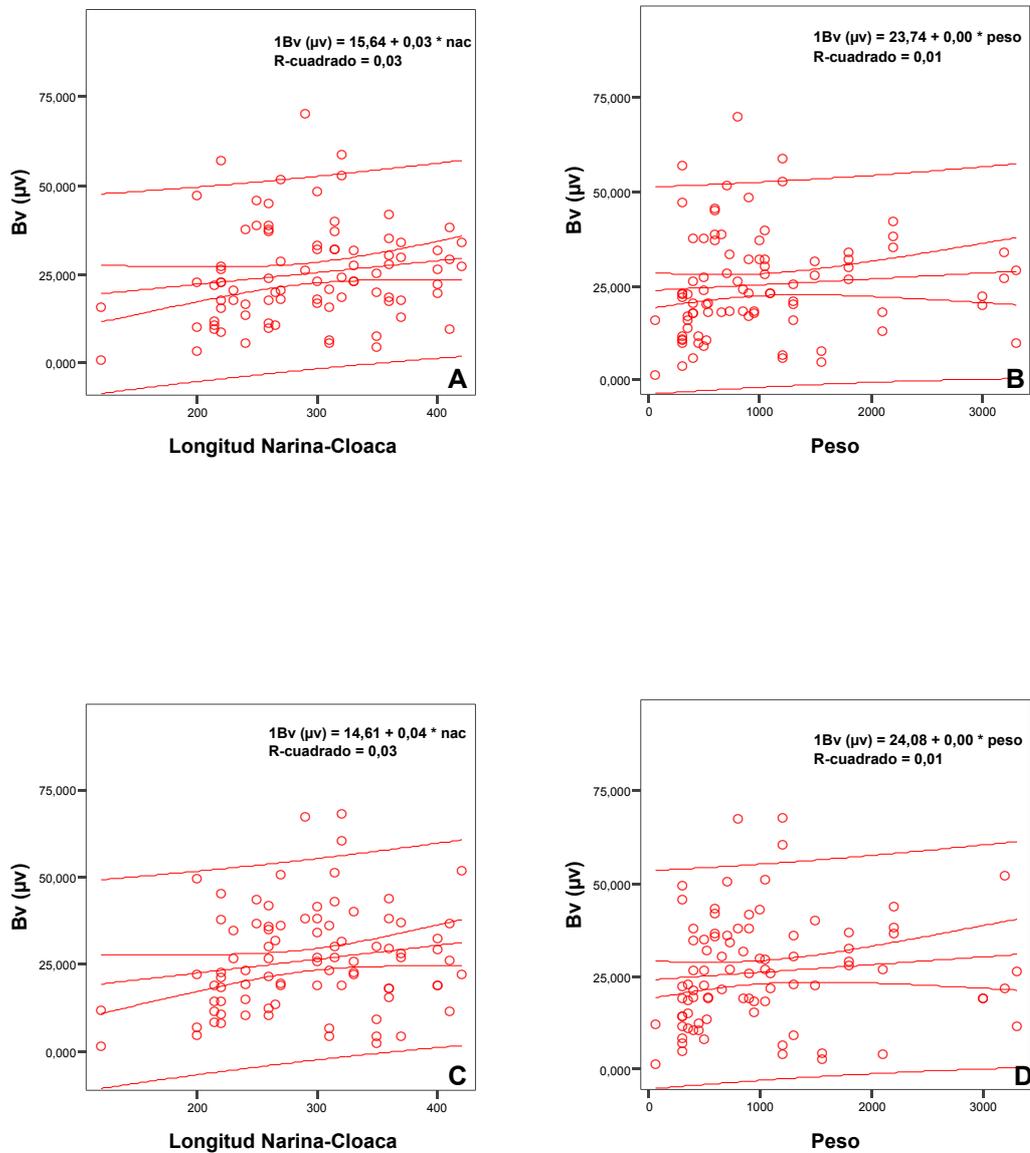


Figura 9. Gráficos de dispersión para la amplitud de la onda **b** y la longitud narina-cloaca y el peso donde existe correlación positiva estadísticamente significativa. **A.** Estímulo escotópico realizado a los cinco minutos. **B.** Estímulo escotópico realizado a los diez minutos.

Tabla 4. Media \pm desviación estándar correspondientes a las variables at (ms), av (μ V), bt (ms) y bv (μ V) en función del sexo obtenidas tras los diferentes estímulos.

Tipo de estímulo	Variable	Macho	Hembra
Flicker	at	29,82 \pm 8,63	29,32 \pm 6,80
	av	2,80 \pm 4,49	2,50 \pm 2,66
	bt	48,65 \pm 10,89	49,17 \pm 7,54
	bv	12,29 \pm 10,14	12,73 \pm 9,16
Fotópico	at	33,52 \pm 5,36	31,55 \pm 6,21
	av	6,68 \pm 4,55	6,13 \pm 4,87
	bt	67,36 \pm 11,376	63,84 \pm 9,29
	bv	24,97 \pm 15,41	26,03 \pm 16,40
Escotópico 5 min.	at	34,12 \pm 5,45	32,58 \pm 5,07
	av	6,29 \pm 4,31	5,85 \pm 4,40
	bt	69,52 \pm 11,65	66,58 \pm 10,18
	bv	26,62 \pm 14,24	24,14 \pm 13,11
Escotópico 10 min.	at	33,36 \pm 5,23	32,62 \pm 6,02
	av	6,92 \pm 4,36	5,79347 \pm 4,52376
	bt	70,02 \pm 12,04	66,10 \pm 10,56
	bv	27,02 \pm 15,16	25,41 \pm 14,16
Escotópico 15 min.	at	33,79 \pm 6,20	31,57 \pm 5,60
	av	6,27 \pm 3,63	6,90 \pm 4,76
	bt	70,95 \pm 11,48	66,48 \pm 10,75
	bv	26,92 \pm 14,16	30,21 \pm 14,97
Escotópico 20 min.	at	34,03 \pm 7,015	32,02 \pm 5,84
	av	6,45 \pm 5,00	7,95 \pm 6,15
	bt	71,63 \pm 11,89	66,26 \pm 11,02
	bv	27,60 \pm 16,14	32,17 \pm 19,26
Escotópico 25 min.	at	33,40 \pm 4,97	31,33 \pm 5,10
	av	6,71 \pm 5,17	8,16 \pm 5,76
	bt	70,22 \pm 12,06	64,80 \pm 9,72
	bv	27,82 \pm 16,00	34,33 \pm 18,45
Escotópico 30 min.	at	31,58 \pm 4,66	31,10 \pm 5,61
	av	6,22 \pm 5,33	8,63 \pm 6,31
	bt	66,15 \pm 16,01	62,30 \pm 10,85
	bv	25,86 \pm 14,98	33,92 \pm 20,77

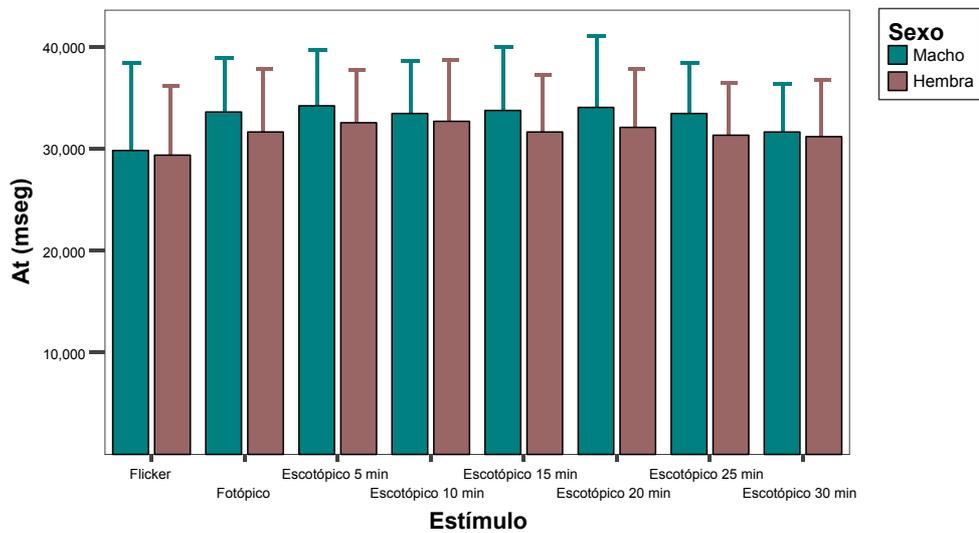


Figura 10. Valores medios y desviación estándar de la variable at obtenidas tras los diferentes estímulos en función del sexo. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre machos y hembras para ninguno de los estímulos.

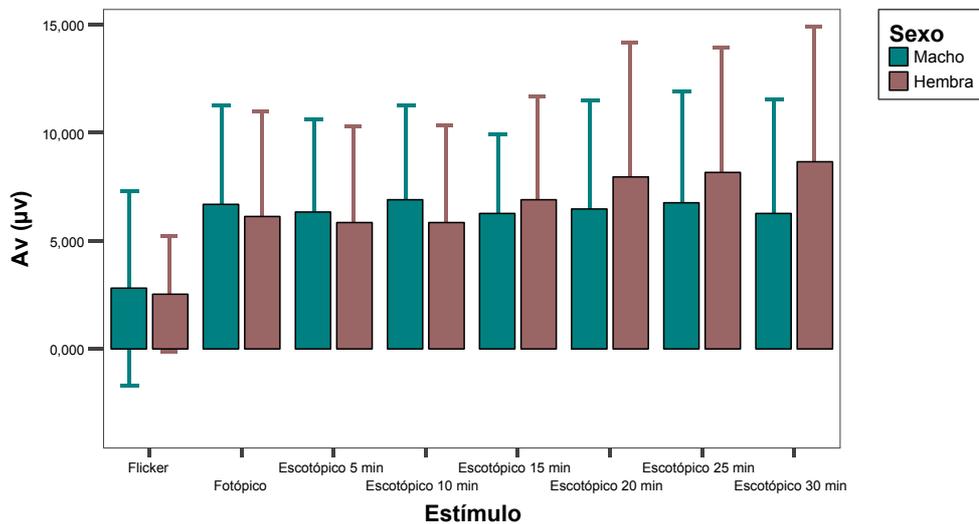


Figura 11. Valores medios y desviación estándar de la variable av obtenidas tras los diferentes estímulos en función del sexo. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre machos y hembras para ninguno de los estímulos.

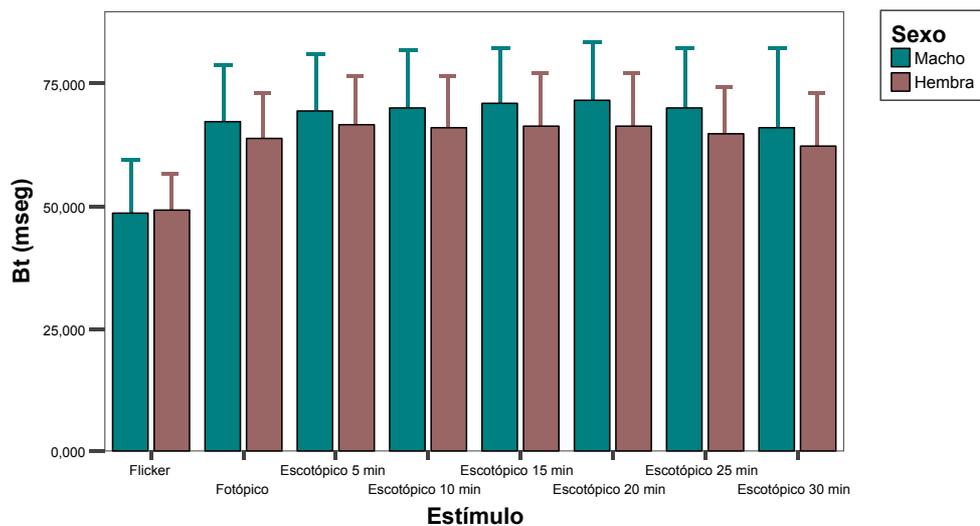


Figura 12. Valores medios y desviación estándar de la variable bt obtenidas tras los diferentes estímulos en función del sexo. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre machos y hembras para ninguno de los estímulos.

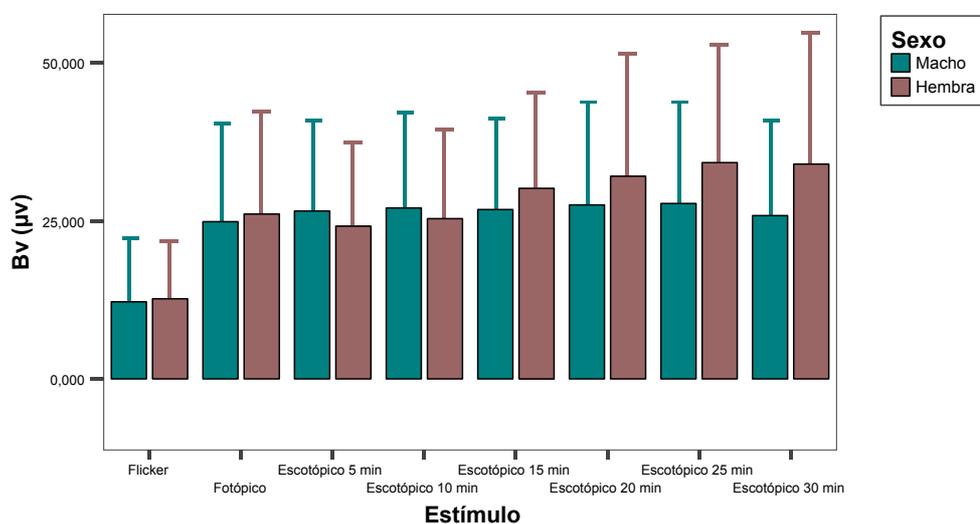


Figura 13. Valores medios y desviación estándar de la variable bv obtenidas tras los diferentes estímulos en función del sexo. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre machos y hembras para ninguno de los estímulos.

Tabla 5. Media \pm desviación estándar correspondientes a las variables at (ms), av (μ V), bt (ms) y bv (μ V) obtenidas tras los diferentes estímulos en ojo derecho (OD) y ojo izquierdo (OI).

Tipo de estímulo	Variable	OD	OI
Flicker	at	9,49 \pm 8,41	29,63 \pm 7,03
	av	2,29 \pm 2,61	3,00 \pm 4,43
	bt	48,76 \pm 9,72	49,08 \pm 8,88
	bv	12,02 \pm 8,57	13,00 \pm 10,57
Fotópico	at	33,40 \pm 5,80	31,64 \pm 5,86
	av	5,85 \pm 4,06	6,93 \pm 5,24
	bt	66,28 \pm 9,80	64,82 \pm 11,09
	bv	24,23 \pm 14,31	26,78 \pm 17,28
Escotópico 5 min.	at	33,51 \pm 4,91	33,14 \pm 5,68
	av	5,43 \pm 3,32	6,68 \pm 5,10
	bt	68,35 \pm 10,12	67,66 \pm 11,81
	bv	23,67 \pm 11,37	26,97 \pm 15,51
Escotópico 10 min.	at	33,02 \pm 5,90	32,93 \pm 5,43
	av	6,16 \pm 4,12	6,51 \pm 4,80
	bt	68,12 \pm 10,89	67,86 \pm 12,01
	bv	25,36 \pm 14,21	27,00 \pm 15,07
Escotópico 15 min.	at	32,37 \pm 5,41	32,87 \pm 6,52
	av	5,77 \pm 3,70	7,433 \pm 4,62
	bt	69,22 \pm 11,10	67,97 \pm 11,53
	bv	27,20 \pm 13,86	30,09 \pm 15,32
Escotópico 20 min.	at	32,85 \pm 5,12	33,10 \pm 7,63
	av	6,50 \pm 5,88	7,98 \pm 5,38
	bt	69,87 \pm 11,52	67,75 \pm 11,90
	bv	27,85 \pm 18,26	32,15 \pm 17,46
Escotópico 25 min.	at	33,05 \pm 5,42	31,69 \pm 4,75
	av	6,52 \pm 5,16	8,37 \pm 5,71
	bt	68,78 \pm 10,72	66,28 \pm 11,75
	bv	28,86 \pm 16,73	33,26 \pm 18,10
Escotópico 30 min.	at	31,42 \pm 5,02	31,24 \pm 5,30
	av	6,87 \pm 5,78	7,98 \pm 6,09
	bt	65,30 \pm 12,57	63,15 \pm 14,88
	bv	28,13 \pm 18,07	31,66 \pm 18,88

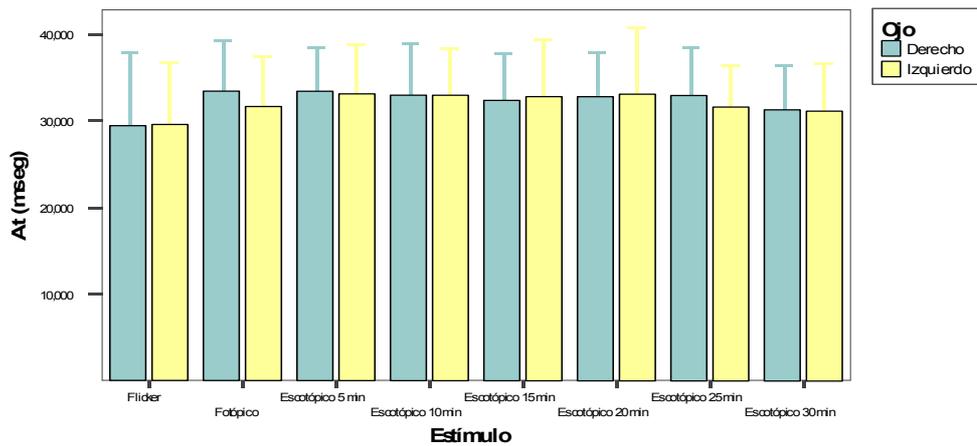


Figura 14. Valores medios y desviación estándar de la variable at obtenidas tras los diferentes estímulos en ojo derecho e izquierdo. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ojos para ninguno de los estímulos.

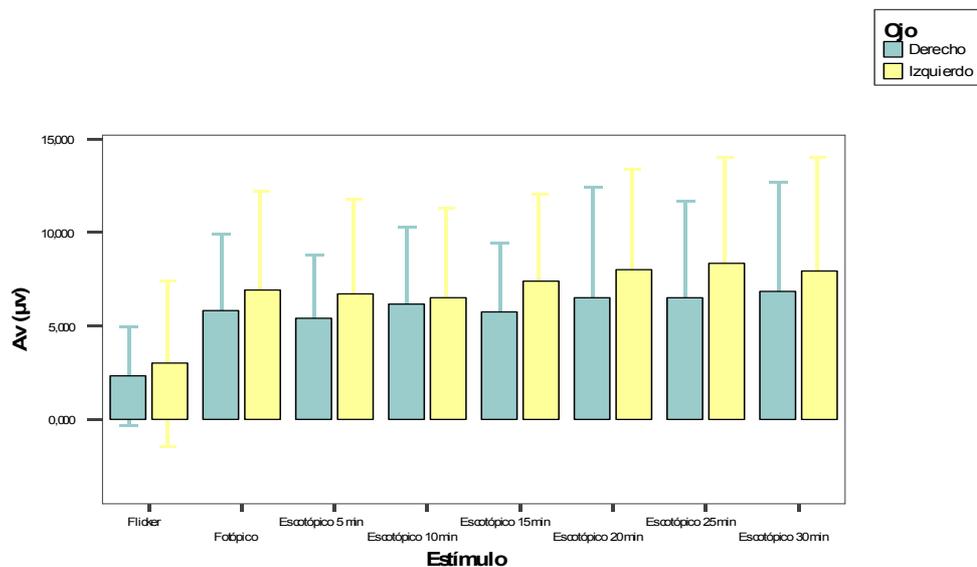


Figura 15. Valores medios y desviación estándar de la variable av obtenidas tras los diferentes estímulos en ojo derecho e izquierdo. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ojos para ninguno de los estímulos.

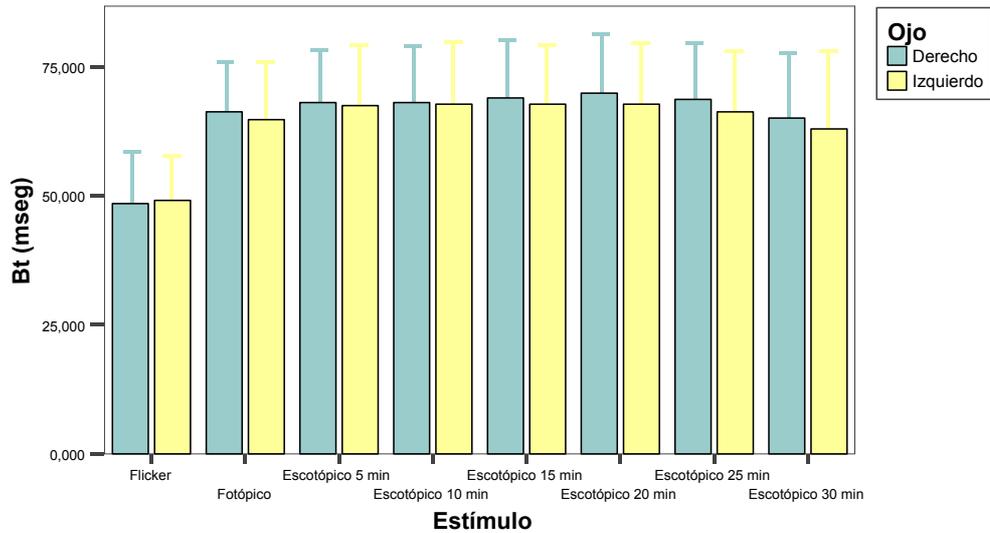


Figura 16. Valores medios y desviación estándar de la variable bt obtenidas tras los diferentes estímulos en ojo derecho e izquierdo. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ojos para ninguno de los estímulos.

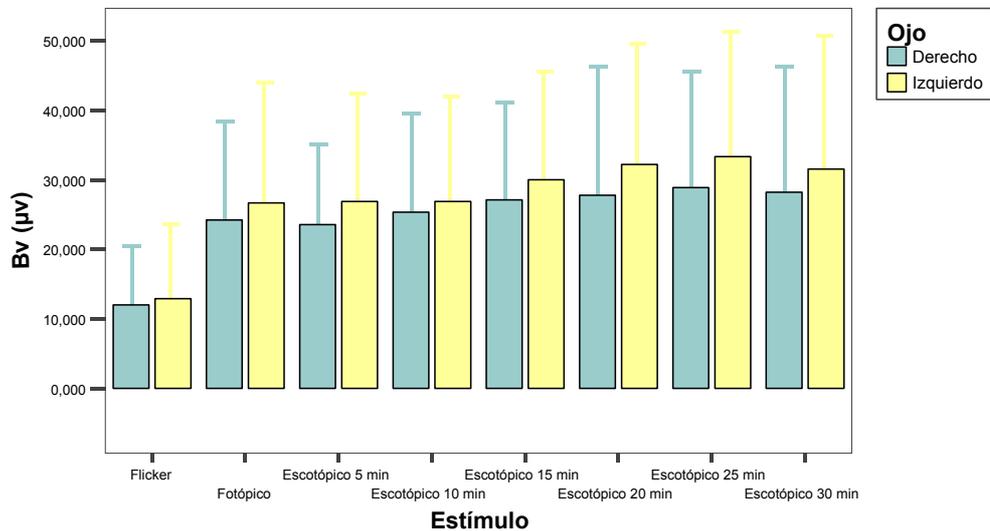


Figura 17. Valores medios y desviación estándar de la variable bv obtenidas tras los diferentes estímulos en ojo derecho e izquierdo. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ojos para ninguno de los estímulos.

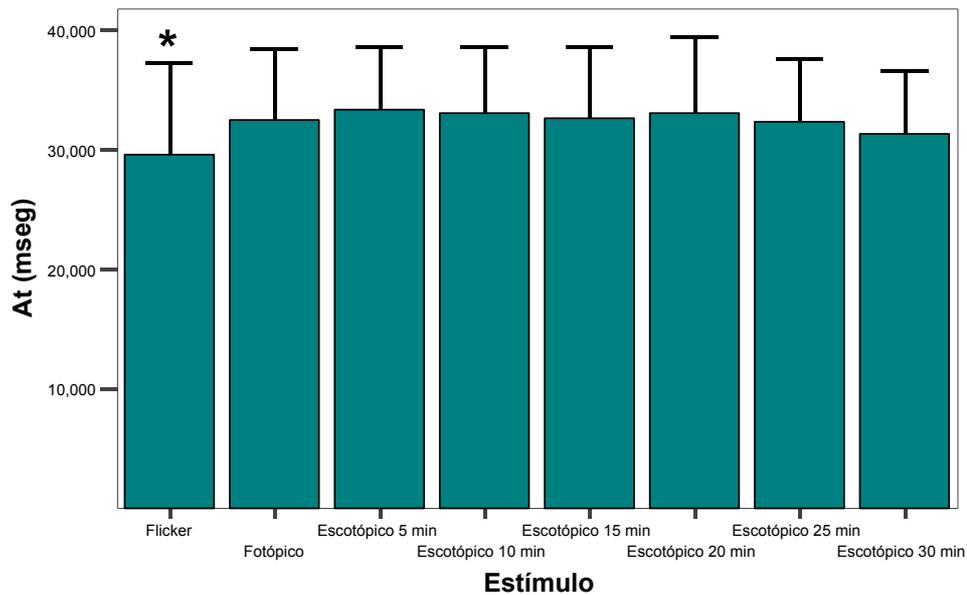


Figura 18. Valores medios y desviación estándar de la variable at obtenidas tras los diferentes estímulos. *, diferencias estadísticamente significativas con el resto de estímulos ($P < 0.05$).

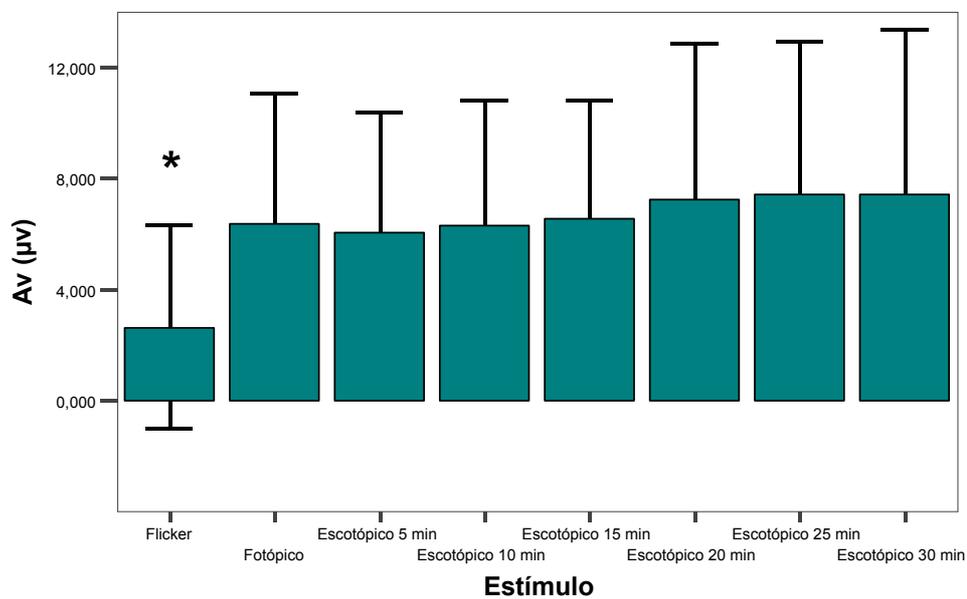


Figura 19. Valores medios y desviación estándar de la variable av obtenidas tras los diferentes estímulos. *, diferencias estadísticamente significativas con el resto de estímulos ($P < 0.05$).

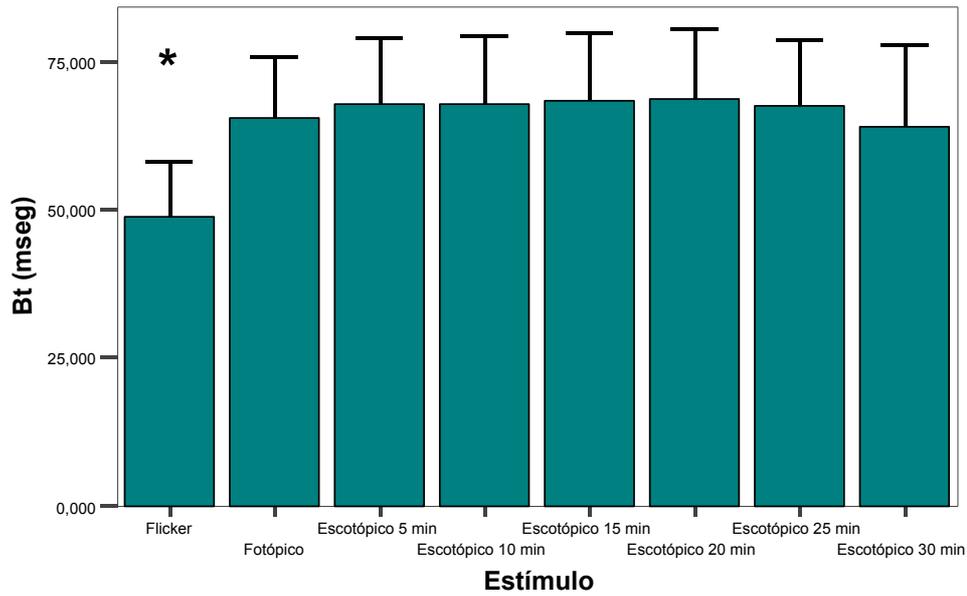


Figura 20. Valores medios y desviación estándar de la variable bt obtenidas tras los diferentes estímulos. *, diferencias estadísticamente significativas con el resto de estímulos ($P < 0.05$).

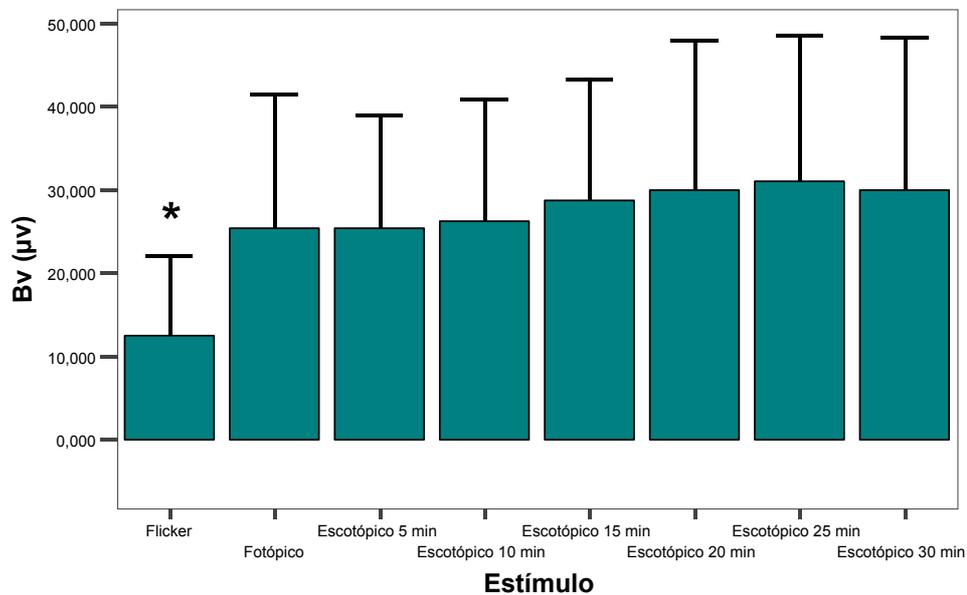


Figura 21. Valores medios y desviación estándar de la variable bv obtenidas tras los diferentes estímulos. *, diferencias estadísticamente significativas con el resto de estímulos ($P < 0.05$).

Tabla 6. Coeficientes de correlación de Spearman y niveles de significación correspondientes entre los diferentes parámetros electroretinográficos obtenidos tras el estímulo flicker.

Rho de Spearman		at	av	bt	bv
at	Coeficiente	1,000	-,418**	,614**	-,416**
	sig (bilat)	.	,000	,000	,000
	N	87	87	87	87
av	Coeficiente	-,418**	1,000	-,309**	,736**
	sig (bilat)	,000	.	,004	,000
	N	87	87	87	87
bt	Coeficiente	,614**	-,309**	1,000	-,208
	sig (bilat)	,000	,004	.	,053
	N	87	87	87	87
bv	Coeficiente	-,416**	,736**	-,208	1,000
	sig (bilat)	,000	,000	,053	.
	N	87	87	87	87

** . La correlación es significativa al 0,01 (bilateral).

* . La correlación es significativa al 0,05 (bilateral).

Tabla 7. Coeficientes de correlación de Spearman y niveles de significación correspondientes entre los diferentes parámetros electroretinográficos obtenidos tras el estímulo fotópico.

Rho de Spearman		at	av	bt	bv
at	Coeficiente	1,000	-,166	,837**	-,370**
	sig (bilat)	.	,125	,000	,000
	N	87	87	87	87
av	Coeficiente	-,166	1,000	-,221*	,800**
	sig (bilat)	,125	.	,040	,000
	N	87	87	87	87
bt	Coeficiente	,837**	-,221*	1,000	-,385**
	sig (bilat)	,000	,040	.	,000
	N	87	87	87	87
bv	Coeficiente	-,370**	,800**	-,385**	1,000
	sig (bilat)	,000	,000	,000	.
	N	87	87	87	87

** . La correlación es significativa al 0,01 (bilateral).

* . La correlación es significativa al 0,05 (bilateral).

Tabla 8. Coeficientes de correlación de Spearman y niveles de significación correspondientes entre los diferentes parámetros electroretinográficos obtenidos tras el estímulo escotópico realizado a los cinco minutos.

Rho de Spearman		at	av	bt	bv
at	Coeficiente	1,000	-,129	,772**	-,360**
	sig (bilat)	.	,232	,000	,001
	N	87	87	87	87
av	Coeficiente	-,129	1,000	,013	,770**
	sig (bilat)	,232	.	,907	,000
	N	87	87	87	87
bt	Coeficiente	,772**	,013	1,000	-,248*
	sig (bilat)	,000	,907	.	,021
	N	87	87	87	87
bv	Coeficiente	-,360**	,770**	-,248*	1,000
	sig (bilat)	,001	,000	,021	.
	N	87	87	87	87

** . La correlación es significativa al 0,01 (bilateral).

* . La correlación es significativa al 0,05 (bilateral).

Tabla 9. Coeficientes de correlación de Spearman y niveles de significación correspondientes entre los diferentes parámetros electroretinográficos obtenidos tras el estímulo escotópico realizado a los diez minutos.

Rho de Spearman		at	av	bt	bv
at	Coeficiente	1,000	-,068	,789**	-,259*
	sig (bilat)	.	,529	,000	,016
	N	87	87	87	87
av	Coeficiente	-,068	1,000	-,102	,780**
	sig (bilat)	,529	.	,349	,000
	N	87	87	87	87
bt	Coeficiente	,789**	-,102	1,000	-,366**
	sig (bilat)	,000	,349	.	,000
	N	87	87	87	87
bv	Coeficiente	-,259*	,780**	-,366**	1,000
	sig (bilat)	,016	,000	,000	.
	N	87	87	87	87

** . La correlación es significativa al 0,01 (bilateral).

* . La correlación es significativa al 0,05 (bilateral).

Tabla 10. Coeficientes de correlación de Spearman y niveles de significación correspondientes entre los diferentes parámetros electroretinográficos obtenidos tras el estímulo escotópico realizado a los quince minutos.

Rho de Spearman		at	av	bt	bv
at	Coeficiente	1,000	-,268*	,767**	-,490**
	sig (bilat)	.	,016	,000	,000
	N	80	80	80	80
av	Coeficiente	-,268*	1,000	-,245*	,715**
	sig (bilat)	,016	.	,029	,000
	N	80	80	80	80
bt	Coeficiente	,767**	-,245*	1,000	-,488**
	sig (bilat)	,000	,029	.	,000
	N	80	80	80	80
bv	Coeficiente	-,490**	,715**	-,488**	1,000
	sig (bilat)	,000	,000	,000	.
	N	80	80	80	80

** . La correlación es significativa al 0,01 (bilateral).

* . La correlación es significativa al 0,05 (bilateral).

Tabla 11. Coeficientes de correlación de Spearman y niveles de significación correspondientes entre los diferentes parámetros electroretinográficos obtenidos tras el estímulo escotópico realizado a los veinte minutos.

Rho de Spearman		at	av	bt	bv
at	Coeficiente	1,000	-,387**	,809**	-,524**
	sig (bilat)	.	,000	,000	,000
	N	80	80	80	80
av	Coeficiente	-,387**	1,000	-,404	,742**
	sig (bilat)	,000	.	,000	,000
	N	80	80	80	80
bt	Coeficiente	,809**	-,404**	1,000	-,556**
	sig (bilat)	,000	,000	.	,000
	N	80	80	80	80
bv	Coeficiente	-,524**	,742**	-,556**	1,000
	sig (bilat)	,000	,000	,000	.
	N	80	80	80	80

** . La correlación es significativa al 0,01 (bilateral).

* . La correlación es significativa al 0,05 (bilateral).

Tabla 12. Coeficientes de correlación de Spearman y niveles de significación correspondientes entre los diferentes parámetros electroretinográficos obtenidos tras el estímulo escotópico realizado a los veinticinco minutos.

Rho de Spearman		at	av	bt	bv
at	Coeficiente	1,000	-,292*	,850**	-,452**
	sig (bilat)	.	,012	,000	,000
	N	73	73	73	73
av	Coeficiente	-,292*	1,000	-,252*	,728**
	sig (bilat)	,012	.	,032	,000
	N	73	73	73	73
bt	Coeficiente	,850**	-,252*	1,000	-,397**
	sig (bilat)	,000	,032	.	,001
	N	73	73	73	73
bv	Coeficiente	-,452**	,728**	-,397**	1,000
	sig (bilat)	,000	,000	,001	.
	N	73	73	73	73

** . La correlación es significativa al 0,01 (bilateral).

* . La correlación es significativa al 0,05 (bilateral).

Tabla 13. Coeficientes de correlación de Spearman y niveles de significación correspondientes entre los diferentes parámetros electroretinográficos obtenidos tras el estímulo escotópico realizado a los treinta minutos.

Rho de Spearman		at	av	bt	bv
at	Coeficiente	1,000	-,069	,810**	-,153
	sig (bilat)	.	,581	,000	,220
	N	66	66	66	66
av	Coeficiente	-,069	1,000	,040	,801**
	sig (bilat)	,581	.	,751	,000
	N	66	66	66	66
bt	Coeficiente	,810**	,040	1,000	-,042
	sig (bilat)	,000	,751	.	,740
	N	66	66	66	66
bv	Coeficiente	-,153	,801**	-,042	1,000
	sig (bilat)	,220	,000	,740	.
	N	66	66	66	66

** . La correlación es significativa al 0,01 (bilateral).

Tabla 14. Valores medios, desviación estándar y niveles de significación (Mann-Whitney) para el ratio bt/at correspondientes a los diferentes tipos de estimulación.

	Fliker	Fotópico	Esc. 5	Esc. 10	Esc. 15	Esc. 20	Esc. 25	Esc. 30
Fliker	-	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000
Fotópico	,000	-	,164	,041	,005	,013	,005	,135
Esc. 5	,000	,164	-	,535	,151	,338	,201	,758
Esc. 10	,000	,041	,535	-	,374	,698	,457	,887
Esc. 15	,000	,005	,151	,374	-	,621	,814	,329
Esc. 20	,000	,013	,338	,698	,621	-	,808	,510
Esc. 25	,000	,005	,201	,457	,814	,808	-	,420
Esc. 30	,000	,135	,758	,887	,329	,510	,420	-

Esc, escotópico

Tabla 15. Valores medios, desviación estándar y niveles de significación (Mann-Whitney) para el ratio bv/av correspondientes a los diferentes tipos de estimulación.

	Fliker	Fot.	Esc. 5	Esc. 10	Esc. 15	Esc. 20	Esc. 25	Esc. 30
Fliker	-	,000	,005	,003	,003	,002	,002	,002
Fotópico	,000	-	,392	,231	,203	,626	,600	,650
Esc. 5	,005	,392	-	,784	,735	,778	,751	,768
Esc. 10	,003	,231	,784	-	,939	,643	,565	,571
Esc. 15	,003	,203	,737	,939	-	,532	,466	,488
Esc. 20	,002	,626	,778	,643	,532	-	,985	,906
Esc. 25	,002	,600	,751	,565	,466	,985	-	,929
Esc. 30	,002	,650	,768	,571	,488	,906	,929	-

Esc, escotópico

DISCUSIÓN

La electroretinografía es un método práctico, de exploración ocular, que sirve para evaluar la funcionalidad a nivel retinal^{12-15,25,128} mediante el registro de la actividad eléctrica de la retina tras una estimulación de tipo luminoso^{6,9,109}, que es aplicable a todas las especies animales; sin embargo, debido a que existen diferencias fisiológicas, anatómicas y morfológicas interespecíficas, es necesario el conocimiento de las mismas como requisito indispensable en el establecimiento de un protocolo y en la interpretación de los resultados obtenidos en un examen electroretinográfico en cada especie^{21,25,115}. Entre estas diferencias se encuentra el tamaño pupilar que influye directamente en la iluminación retiniana²⁵, la existencia y extensión del *tapetum lucidum*^{16,25} (capa que se sitúa en la coroides y refracta los fotones), el tipo de población y densidad de fotorreceptores presentes en la retina^{16,25}. Estas mismas diferencias son también las causantes de la variación entre individuos de una misma especie^{16,25}.

El registro extracelular de cualquier actividad eléctrica en un tejido vivo es posible cuando dicha actividad eléctrica se conduce a lo largo de una matriz extracelular con resistencia eléctrica⁹. Un ejemplo de este hecho es el registro de electroretinogramas tras la estimulación luminosa de la retina. Dichos registros se pueden realizar con electrodos situados en distintas localizaciones -como ya se ha comentado previamente-, algunas más invasivas y cruentas que otras; por ejemplo, las que se realizan en diferentes niveles de la retina o en vítreo son más invasivas y cruentas que las que se hacen en medicina humana y en veterinaria actualmente -como en nuestro estudio- en la superficie corneal⁹. En el caso de la retina, se generan corrientes eléctricas extracelulares que se dirigen radial y lateralmente. Las corrientes que se dirigen lateralmente se cancelan unas a otras, debido a la simetría de la retina. Por tanto, cuando se produce una estimulación homogénea sobre toda la superficie retinal, solamente las corrientes eléctricas que se dirigen radialmente son las que se registran en el electroretinograma⁹. En el caso del protocolo electroretinográfico descrito para el perro^{21,112} y en nuestro estudio, debido a la localización de los electrodos^{9,21}, el circuito eléctrico está formado por los siguientes elementos: retina, vítreo, cristalino, córnea, tejidos extra-oculares (hueso, músculo, subcutáneo y piel), esclera, coroides, epitelio pigmentario y,

de nuevo, retina. Todos estos tejidos tienen resistencias diferentes^{9,21}. Debido a que, tanto entre especies como entre individuos, existen diferencias en la distribución, la proporción y las características de estos tejidos, dichas diferencias provocan resistencias también diferentes, y, por ende, también generan variabilidad en cuanto a las amplitudes de los electroretinogramas^{9,21}. Por todo esto, es necesario obtener los valores electroretinográficos normales en cada especie, y, además, también es importante incluir la localización anatómica de los electrodos dentro del protocolo del examen electroretinográfico, ya que las diferencias anatómicas del cráneo influye en las resistencias²¹.

Los exámenes electroretinográficos realizados en la iguana verde descritos en la bibliografía consultada^{2-5,33,34} son procedimientos invasivos, y por lo tanto, de poco interés en el diagnóstico clínico. Esos procedimientos consistían, por ejemplo, en insertar los electrodos activos en vítreo y los de referencia, por detrás de la órbita del ojo; además, reseccionaban los párpados superiores para exponer la esclera y suturaban los inferiores hacia abajo para que no cubrieran la pupila²⁻⁵. En otros estudios³³⁻³⁴ los electrodos corneales eran recubiertos por silicona, los de referencia eran insertados en subcutáneo y los párpados eran suturados a la piel para mantener expuesta continuamente la pupila. Además, en dichos estudios algunas iguanas eran pinealectomizadas, a otras se les seccionaba el nervio óptico, otras recibían fármacos inyectados en vítreo y otras eran eutanasiadas y los globos oculares reseccionados al final del experimento^{33,34}. En nuestro caso el examen electroretinográfico realizado en la iguana verde (*Iguana iguana*) se realizó de forma no invasiva, con la colocación de los electrodos activos de tipo lentilla en la córnea y los de referencia en la piel, al igual que se realiza en otras especies animales^{8,9}, como en el caso del perro^{21,112}, permitiendo obtener electroretinogramas de buena calidad y de forma repetitiva, tanto en condiciones fotópicas como escotópicas.

Para realizar el presente estudio se comenzó por evaluar la idoneidad, en lo referente a su estado de salud, de los individuos que formaron parte del estudio mediante la realización de un examen físico, una hematología y bioquímica sanguínea y una exploración oftalmológica general, procedimientos que se realizaron sin necesidad de anestésicos a las iguanas. Este hecho evitó

alargar el período anestésico o el incremento de las dosis de los anestésicos empleados, con lo que se mejoró la seguridad de todo el protocolo.

En relación a la biometría corporal, la longitud narina-cloaca es una medida utilizada en lacértidos que puede obtenerse con suficiente precisión en animales vivos, y que, en condiciones patológicas, está menos sujeta a la variación que otras medidas biométricas comúnmente utilizadas, como es el peso¹⁷¹. Tales parámetros han sido utilizados en otros estudios, entre ellos uno ecocardiográfico realizado en la iguana verde, en el cual se obtuvieron correlaciones significativas entre algunas dimensiones cardíacas y los indicadores del tamaño corporal (peso, longitud narina-cloaca)¹⁷². Por eso, en este estudio, como parte del análisis estadístico, se realizaron correlaciones de las diferentes variables electroretinográficas con respecto al peso y a la longitud narina-cloaca.

Se obtuvieron correlaciones positivas débiles para algunos estímulos entre las variables de amplitud con respecto al peso y a la longitud narina-cloaca; sin embargo, las ecuaciones de regresión lineal no resultaron del todo satisfactorias; este hecho, sugiere que no existe influencia del tamaño corporal en los parámetros electroretinográficos en esta especie, al contrario de lo que sucede en el perro^{21,25}. Tal y como se ha comentado previamente, es posible que la utilización de otras medidas biométricas, tales como las del cráneo y/o globo ocular pudieran revelar resultados diferentes^{9,16,21,25}, por lo que quizás deberían ser incluidas en estudios futuros. En este sentido, en el perro, y debido a la gran variabilidad anatómica entre razas¹⁷³, los resultados del examen electroretinográficos se distinguen por razas y grupos de edad^{21,24,25}. En nuestro caso, al no existir diferentes razas dentro de la especie Iguana iguana solamente hemos tenido que utilizar el peso y la longitud narina-cloaca como posibles factores de variación de los resultados electroretinográficos.

Los reptiles son animales ectotérmicos, es decir, que gozan de una temperatura corporal cuya regulación depende de fuentes exógenas; de esta manera, su termorregulación se basa en un comportamiento por el cual van desplazándose por los diferentes gradientes de temperatura que ofrece el medio en el cual se encuentran^{161,162}. Esta característica fisiológica condiciona

la necesidad de que la temperatura ambiental se sitúe dentro de un rango o gradiente térmico óptimo para mantener la homeostasis^{161,162}. Esta característica fisiológica se tuvo en cuenta a la hora de la realizar la electroretinografía, de forma que se mantuvo la temperatura ambiental de la sala de oftalmología entre 29-30°C, es decir, dentro del rango óptimo descrito para la iguana verde (Iguana iguana)^{161,162}. De hecho, la temperatura corporal influye en los valores que se obtienen en el examen electroretinográfico tanto en mamíferos como en reptiles^{2,174}. En el gato y en la cobaya se ha descrito una mayor sensibilidad de la onda **b**, manifestándose por una disminución de sus valores en el electroretinograma, respecto a la onda **a** en condiciones de hipotermia^{2,174}. Así mismo, también se ha descrito una disminución de todos los componentes del electroretinograma en el gecko tokay y en la iguana verde en condiciones de hipotermia, aunque en estos casos se lograron registrar electroretinogramas incluso a 5°C².

En el examen electroretinográfico del perro las pupilas deben encontrarse totalmente dilatadas durante todo el examen electroretinográfico para conseguir una iluminación total y homogénea en la retina^{21,112}. Normalmente, para conseguir una correcta midriasis durante toda la electroretinografía es preferible el empleo de colirios ciclopléjicos, como la tropicamida, un fármaco parasimpaticolítico, antes de comenzar el examen electroretinográfico¹⁷⁵. En el caso de la iguana verde, en concreto, y en los reptiles y aves en general, no se emplean colirios ciclopléjicos debido a que el iris posee una musculatura estriada; y por lo tanto, dichos colirios no son efectivos para producir una midriasis completa¹⁶⁷. En estas especies, la midriasis se provoca mediante el empleo de pequeñas dosis diluidas de bloqueantes neuromusculares, como, por ejemplo, la D-Tubocurarina, inyectados en la cámara anterior del ojo; no obstante, este procedimiento no deja de ser invasivo¹⁶⁷. Además, el empleo de colirios que contienen bloqueantes neuromusculares no termina de producir una midriasis correcta². En nuestro caso, la midriasis se consiguió mediante la anestesia general inducida y mantenida por la combinación de ketamina y medetomidina, con lo que se evitó la inyección intracameral de bloqueantes neuromusculares.

La realización de un examen electroretinográfico en el perro recomienda una adaptación fotópica de, al menos, diez minutos para conseguir una correcta adaptación de la retina a la luz, es decir, para conseguir una correcta desensibilización de todos los bastones^{21,112}. En nuestro estudio, dicha adaptación fotópica se consiguió en la sala de oftalmología mientras se realizaba la biometría y la exploración oftalmológica general.

Posteriormente se procedió a la anestesia de los animales con un protocolo similar al descrito para la realización del examen electroretinográfico en el perro^{24,169}. La utilización de anestesia está indicado en el examen electroretinográfico del perro^{21,112,116}. Sin embargo, existen citas puntuales, en la bibliografía consultada, de realización de electroretinogramas en el perro y en el gato sin la utilización de anestesia^{176,177}; sin embargo, este tipo de procedimiento para la realización de un examen electroretinográfico no es aplicable a nivel clínico, debido a que, por un lado, se necesitan muchos días para enseñar y acostumbrar al animal al uso de las lentes de contacto y los estímulos luminosos, y, por otra parte, se produce mucho ruido de fondo, ya que es muy difícil mantener al animal totalmente inmóvil^{1,24}. En la bibliografía consultada los protocolos anestésicos utilizados en los exámenes electroretinográficos realizados en iguana verde tampoco son de utilidad a nivel clínico y además no cumplen los requisitos descritos para el perro^{2-5,33,34,21,112}. Dichos protocolos utilizan la vía oral o intraperitoneal, vías que actualmente no están recomendadas para la administración de unos agentes anestésicos, que hoy en día tampoco se utilizan en reptiles¹⁷⁸, y, además, las iguanas permanecieron anestesiadas un mínimo de 24 horas seguidas^{2-5,33,34}.

En este estudio se decidió utilizar un protocolo de anestesia general basado en la combinación de un α 2-adrenérgico (medetomidina) y de un anestésico disociativo (ketamina), ya que, dicha combinación consigue cumplir los criterios indicados para el examen electroretinográfico en el perro: permitir la realización de un protocolo de electroretinografía de, al menos, treinta minutos sin modificar, o con leve modificación del electroretinograma¹¹⁶, permitir una buena miorelajación para evitar el registro de electromiogramas¹¹⁶ e inhibir el reflejo fotomioclónico¹¹⁹. De esta forma, en el presente estudio, la anestesia utilizada permitió realizar un examen electroretinográfico completo

(flicker, fotópico y curva de adaptación escotópica de treinta minutos) con obtención de electroretinogramas de buena calidad en todos los animales.

Al contrario de lo que sucede en mamíferos, las aves¹⁷⁹ y los reptiles¹⁸⁰ tienen un sistema renal portal por el que el retorno venoso de la mitad posterior del cuerpo del reptil puede dirigirse, mediante un complejo mecanismo neuroendocrino¹⁷⁹, en primer lugar, al riñón antes de alcanzar la circulación general¹⁸⁰. Según el fármaco inyectado, este sistema puede alterar la farmacocinética de dicho fármaco y, además, se puede incrementar la nefrotoxicidad si se compara con las inyecciones realizadas en la mitad craneal del cuerpo. Debido a que existen pocos estudios en relación a que fármacos pueden administrarse de forma segura en la mitad caudal y cuales no¹⁸¹⁻¹⁸³, la recomendación es que cualquier fármaco que deba administrarse parenteralmente se haga en la mitad anterior del cuerpo¹⁸⁴. En nuestro estudio la inyección intramuscular de la combinación neuroleptoanalgésica se realizó en un miembro anterior como está recomendado en lacértidos¹⁸⁴.

Uno de los electrodos corneales más comúnmente empleados en animales de compañía para obtener registros electroretinográficos son el tipo ERG-jet. Estos electrodos se colocaron fácilmente en todas las iguanas de este estudio, y realizaron, además, funciones de blefarostato, con lo que mantenían el ojo abierto durante todo el examen electroretinográfico y evitaban los movimientos palpebrales que pudieran interferir con los resultados del electroretinograma. Otro tipo de electrodos corneales utilizados fue el tipo hilo conductor (DTL), que se utilizó solamente en la iguana más pequeña de este estudio debido al reducido diámetro corneal y de la fisura palpebral, con lo que se obtuvieron resultados igualmente óptimos.

Para mejorar la conducción de las señales eléctricas generadas por la retina y el mantenimiento de los electrodos -tanto los del tipo ERG-jet como los de hilo conductor DTL- con la superficie corneal se aplicó un colirio de carbómero entre los mismos y la córnea. Asimismo, el colirio evitó una excesiva sequedad corneal en los animales y, por tanto, la aparición de lesiones superficiales en la córnea. En cuanto al resto de electrodos dérmicos (temporales y de referencia), fueron mantenidos mediante pasta conductora de electroretinografía, la cual produjo buenos resultados durante todo el examen

electrorretinográfico en el sentido de, al igual que se hizo con los electrodos corneales, mejorar la conducción eléctrica y el mantenimiento de los mismos a la piel, o, en nuestro caso, a las escamas dérmicas, como también se encuentra descrito en el perro²¹.

En la bibliografía consultada los fotoestimuladores utilizados en la realización de los exámenes electroretinográficos en la iguana verde han sido lámparas²⁻⁵. En el caso del perro se utilizan los fotoestimuladores tipo mini-Ganzfeld, entre otros^{21,24}; además, se recomienda que la estimulación de los ojos se realice, si no al mismo tiempo, al menos en la misma sesión²⁴. En nuestro estudio también utilizamos estimuladores tipo mini-Ganzfeld. Este tipo de fotoestimuladores funcionaron bien y resultaron prácticos para el examen electroretinográfico en la iguana verde; sin embargo, debido a que en la mayoría de los animales de nuestro estudio la distancia interpupilar y la longitud de la cabeza fue superior a las dimensiones del fotoestimulador, no se pudo introducir toda la cabeza dentro del mismo para conseguir una estimulación completa y homogénea de ambas retinas simultáneamente; por ello se decidió estimular los ojos de manera alternativa. Esta sistemática, que también es utilizada en el examen electroretinográfico en el perro^{21,112}, permitió conseguir electroretinogramas de buena calidad en las iguanas de este estudio.

El medidor de medias de señales y el ancho de banda utilizado en este estudio sirvió eficazmente para evitar ruidos de fondo. En nuestro caso la principal fuente de ruido era la actividad electromiográfica, sobre todo la originada por movimientos palpebrales, según se describe en la bibliografía consultada^{1,6}. No obstante, como se comentó anteriormente, tales movimientos fueron minimizados con la utilización de los electrodos corneales como si fueran blefarostatos y la elección de un protocolo anestésico adecuado.

Respecto al análisis cualitativo de los registros, en nuestro caso la morfología de las ondas obtenidas en los electroretinogramas resultaron similares a las recogidas en otras especies animales, es decir, se observaron claramente una onda **a** y una onda **b**^{1,21}, mostrando una morfología con pendientes suaves y bases amplias. Esta morfología es compatible con una cinética lenta tanto en la génesis como en la conducción de la fotorrespuesta,

como sucede en el perro cuando se estimulan los fotorreceptores tipo bastones⁹. En nuestro caso, hemos tenido en cuenta que los estudios histológicos de la retina en saurios de hábitos diurnos descritos en la bibliografía describen una retina compuesta, sobre todo, por fotorreceptores tipo cono³⁰; además, al análisis cuantitativo refleja un comportamiento de la retina compatible con dichos estudios histológicos. Por tanto, se puede concluir que esta morfología compatible con una cinética lenta puede deberse a un metabolismo basal bajo típico de la clase reptiles, el cual es, al menos, cuatro veces menor que el de la clase mamíferos¹⁸⁵.

En lo que se refiere al análisis cuantitativo, en el perro, los análisis estadísticos descritos en la bibliografía agrupan los valores obtenidos del ojo derecho y del izquierdo, así como de machos y hembras^{21,24}. En nuestro estudio los análisis de varianza no mostraron diferencias estadísticamente significativas para las variables at, av, bt y bv entre ambos ojos, ni entre machos y hembras para cada tipo de estímulo, por lo que los valores pudieron ser también agrupados.

En el presente estudio, los valores estadísticos descriptivos de las variables electroretinográficas con respecto a los estímulos realizados a la misma frecuencia de estimulación, independientemente del estado de adaptación de la retina, mostraron poca variación. Este hecho se confirma mediante los análisis de varianza realizados en los que no existen diferencias estadísticamente significativas para dichas variables entre los estímulos fotópicos y escotópicos y entre los distintos estímulos escotópicos. Estos resultados electroretinográficos indican que en la iguana verde la retina está constituida fundamentalmente por fotorreceptores tipo cono². Sin embargo, sí existen diferencias estadísticamente significativas para las variables at, av, bt y bv entre el estímulo con una frecuencia de 30 Hz y los estímulos con una frecuencia de 4.9 Hz. Este hallazgo puede deberse a que los circuitos que se ponen en marcha procedentes de los conos son diferentes según la frecuencia de estímulo empleado, como así sucede en el perro²⁴.

Hay que tener en cuenta que los parámetros en relación con el tiempo, at y bt, son más sensibles a las condiciones externas y a la cuantificación que los parámetros del voltaje; además, estos últimos se ven afectados por la

variación que existe entre especies e incluso entre individuos dentro de una misma especie^{6,9,16,21,25}. En nuestro estudio se ha observado una gran variabilidad, determinada por una alta desviación estándar, del voltaje para la onda **a** y sobre todo para la onda **b**, al igual que se ha observado en el perro^{6,16,21,24,115}.

La correlación positiva encontrada entre los valores de a_v y b_v , independientemente del estímulo utilizado, se debe a que, por convención, la amplitud de la onda **b** incluye a la onda **a**. De forma análoga, como el tiempo de latencia de la onda **b** incluye el de la onda **a**, también en este caso se encontró correlación positiva entre los valores de a_t y b_t independientemente del estímulo utilizado.

Los fenómenos cíclicos están presentes de manera bastante frecuente en nuestro mundo (fotoperiodos, mareas, estaciones...); por eso, los organismos han aprendido a prepararse y a anticiparse a estos cambios cíclicos para mejorar su supervivencia y adaptabilidad al medio externo mediante el desarrollo de relojes internos que se adaptan a estos cambios cíclicos¹⁸⁶. Los mejores ejemplos, y más conocidos, de estos relojes internos son los ritmos circadianos, es decir, los ritmos que se adaptan a los ciclos de 24 horas. Estos ritmos circadianos están presentes en la mayoría de los organismos eucariotas¹⁸⁶. En la bibliografía consultada se ha descrito la influencia de los ritmos circadianos en distintas variables fisiológicas, como, por ejemplo, en algunos valores de bioquímica sanguínea o hemodinámicos, en la producción de lágrima, en la presión intraocular e incluso en la regulación de la secreción endógena de tiroxina, en distintas especies animales (periquito, caballo, gallina, perro, gato)¹⁸⁷⁻¹⁹³. Entre estas variables se han descrito las variaciones debidas al ritmo circadiano en diversos aspectos de las funciones visuales. Estas variaciones se han demostrado, entre otros exámenes, mediante la observación de los cambios de los electroretinogramas realizados, en distintos ensayos^{33,34}, en distintas especies animales (invertebrados, peces, aves y mamíferos)¹⁹⁴⁻¹⁹⁷. En nuestro caso todos los exámenes electroretinográficos se realizaron en horario matutino para homogenizar la muestra estadística en cuanto a la posible variación debida al ritmo circadiano de la iguana verde^{33,34}; sin embargo, sería interesante realizar estudios futuros

en los que se podrían incluir electroretinogramas realizados en distintos intervalos horarios durante el día y la noche para caracterizar la posible influencia del ritmo circadiano en los exámenes electroretinográficos realizados según el protocolo descrito en este estudio para la iguana verde.

El conjunto de los resultados obtenidos en este estudio sugieren que la retina de la iguana verde está constituida fundamentalmente por fotorreceptores tipo cono. Este hecho es compatible con los estudios histológicos realizados en algunos géneros de saurios de hábitos diurnos, en los que, mediante microscopía electrónica, se constató únicamente la presencia en sus retinas de poblaciones de células fotorreceptoras de tipo cono³⁰. Por tanto, el examen electroretinográfico en la iguana verde debe basarse principalmente en una evaluación fotópica²⁵.

CONCLUSIONES

1. El protocolo electroretinográfico utilizado permite obtener electroretinogramas de buena calidad de forma rápida y repetitiva de manera no invasiva.
2. Los valores electroretinográficos obtenidos son compatibles con la existencia de una retina constituida por fotorreceptores fotópicos en la iguana verde (*Iguana iguana*).
3. No se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en los parámetros electroretinográficos obtenidos de registros en el ojo izquierdo o el derecho así como entre iguanas machos y hembras.
4. No se han encontrado correlaciones significativas entre los parámetros electroretinográficos y las variables biométricas estudiadas. Por tanto, el peso y la longitud narina-cloaca no pueden ser utilizados como predictores de los valores electroretinográficos.
5. En base a los resultados obtenidos, se recomienda, para la iguana verde, la realización de un examen electroretinográfico basado en un estímulo flicker y otro fotópico para la evaluación de los fotorreceptores tipo cono.

RESUMEN

La técnica electroretinográfica consiste básicamente en estimular con luz la retina en unas condiciones ambientales dadas y, a continuación, registrar las respuestas de la retina a ese estímulo luminoso.

En nuestro estudio los objetivos que se plantearon fueron el estandarizar un protocolo de examen electroretinográfico en iguanas verdes sanas para obtener electroretinogramas normales, determinar los fotorreceptores existentes en la retina y evaluar la influencia del peso y la longitud narina-cloaca en los distintos parámetros electroretinográficos. En la bibliografía consultada existen pocos estudios referentes a la electroretinografía en la iguana verde; además, ninguno de dichos estudios emplea un protocolo estandarizado y aceptado para el examen oftalmológico en medicina humana y veterinaria.

En la realización del estudio se emplearon 44 iguanas verdes (*Iguana iguana*) adultas de ambos sexos –21 machos y 23 hembras-, clínicamente sanas que procedían del Centro de Recuperación de Fauna Silvestre “El Valle” o del Servicio de Animales Exóticos y de Oftalmología del Hospital Clínico Veterinario de la Universidad de Murcia. El protocolo electroretinográfico realizado fue similar al establecido por el European College of Veterinary Ophthalmology-European Society of Veterinary Ophthalmology para el perro y permitió obtener electroretinogramas de buena calidad y de forma repetitiva. En nuestro caso el examen electroretinográfico se realizó con el electroretinógrafo modelo Roland consult que incorporó el software RETIsystem versión 1.32. La combinación de medetomidina, a la dosis de 100 µg/kg, y ketamina, a 10 mg/kg, mantuvo a las iguanas en un plano anestésico adecuado durante todo el examen electroretinográfico y además cumplió los requisitos descritos para el perro.

La morfología de las ondas mostró una base ancha y unas pendientes suaves, es decir, cinéticas lentas. No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre el ojo derecho y el izquierdo ni entre machos y hembras, por lo que al final la muestra considerada para el estudio estadístico fue igual a 88. Las medidas biométricas –peso y longitud narina-cloaca- no nos fueron de utilidad para predecir los valores

electrorretinográficos, debido a que no se obtuvieron correlaciones significativas.

Tras el análisis cuantitativo, los valores obtenidos confirman la existencia de una retina simple constituida fundamentalmente por fotorreceptores tipo cono. Este hecho sugiere que el examen electroretinográfico en la iguana verde se puede establecer en un protocolo basado principalmente en una evaluación fotópica.

SUMMARY

The electroretinographic technique essentially consists in using light to stimulate the retina in a particular set of environmental conditions. Then, a record is kept of the retina response to the luminous stimulus.

The following goals were set for the present research: (i) to develop a protocol for electroretinographic exam in healthy green iguanas in order to elicit normal electroretinograms; (ii) to determine which types of photoreceptors exist in the retina; (iii) to assess the influence which the weight and the snout-vent length exert on the electroretinographic parameters. In the literature references consulted, there are few studies on electroretinography in the green iguana. Besides, none of such studies has resorted to any standard and widely accepted protocol for ophthalmologic exam in either human or veterinary medicine.

The sample consisted 44 green iguanas (*Iguana iguana*) of both sexes, 21 males and 23 females. All the animals were clinically healthy and stemmed either from the Wildlife Rehabilitation Centre "El Valle" (Región of Murcia, Spain), or from the Exotic Animal Service at the Veterinary Teaching Hospital (Univ. of Murcia), or from the Ophthalmology Service at the aforementioned hospital. The electroretinographic protocol was similar to the one established by the European College of Veterinary Ophthalmology-European Society of Veterinary Ophthalmology in dogs, and it allowed us to elicit reliable and reproducible electroretinograms. The electroretinograph utilised was the Roland Consult model, which incorporated the software RETIsystem 1.32. The combination of medetomidine, in a dose of 100 µg/kg, with ketamine, in a dose of 10 mg/kg, was useful for keeping the iguanas in the adequate anesthetic depth during the whole procedure. Moreover, this combination met the requirements for electroretinographic exam in the dog.

The morphology of the waves indicated slow kinetics, as shown in the breadth of the basis and the smooth of the slopes. No statistically significant differences were found either between RE and LE or between male and female animals. Therefore, the definite sample for statistical purposes was 88. Biometric measurements (i.e. weight and snout-vent length) were not useful for

predicting electroretinographic values, since they did not yield statistically significant correlations.

The results obtained in the quantitative analysis were consistent with the simplex, pure cone retina. This suggests that the electroretinographic exam in the green iguana can abide by a protocol based mainly on photopic evaluation.

BIBLIOGRAFÍA

1. Sims MH. Electrodiagnostic evaluation of vision. En: Gelatt KN (ed). Veterinary ophthalmology. Lea&Febiger. Philadelphia 1991: 483-507.
2. Meneghini KA, Hamasaki DI. The electroretinogram of the iguana and tokay gecko. Vision Res 1967; 7: 243-251.
3. Hamasaki DI. Properties of the parietal eye of the green iguana. Vision Res 1968; 8: 591-599.
4. Hamasaki DI. The spectral sensitivity of the lateral eye of the green iguana. Vision Res 1968; 8: 1305-1314.
5. Hamasaki DI, Peregrin J. A blue-sensitive system in the lateral eye of the green iguana. Vision Res 1970; 10: 121-127.
6. Rosolen SG, Lazard P, Isard PF, Rigaudière F. Electrophysiologie visuelle sensorielle : L'électrorétinogramme du chien. Société Française d'Etudes et de Recherches en Ophtalmologie Vétérinaires. 2000.
7. Chrisman CL. Disfunción visual. En: Problemas neurológicos en pequeñas especies. Cheryl L Chrisman (ed). Compañía editorial Continental SA de CV. México 1986: 195-205.
8. Seeliger MW. Current developments in Retinal Electrodiagnostics. En: Proceedings of the 1st European Conference on the Veterinary Visual Electrophysiology and the combined scientific meeting of the E.C.V.O. and the E.S.V.O. Wien 2000: 4-5.
9. Perlman I. <http://www.webvision.med.utah.edu/ERG.html>. Última consulta: 17/10/2003.
10. Breton ME, Montzka DP. Empiric limits of rod photocurrent component underlying a-wave response in the electroretinogram. Doc Ophthalmol 1992; 79: 337-361.

11. Heaton-Jones T, Samuelson D, Brooks D, et al. Mercury analysis in the eye and visual pathways of the American Alligator. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994; 35:1514.
12. Aguirre, GD. Electroretinography in veterinary ophthalmology. *J Am Anim Hosp Assoc*. 1973; 9: 234-7.
13. Acland GM. Diagnosis and differentiation of retinal diseases in small animals by electroretinography. *Semin Vet Med Surg Small Anim* 1988; 3: 15-27.
14. Yanase J, Ogawa H, Ohtsuka H. Rod and cone components in the dog electroretinogram during and after dark adaptation. *J Vet Med Sci* 1995; 57: 877-81.
15. Narfström K, Andersson BE, Andreasson S, Gouras P. Clinical electroretinography in the dog using Ganzfeld stimulation: A practical method of examining rod and cone function. *Doc Ophthalmol* 1995; 90: 279-90.
16. Rosolen SG, Lazard P, Isard P-F, Rigaudière F. Variability of ERG wave components on normal Beagle dog. En: *Proceedings of the 1st European Conference on the Veterinary Visual Electrophysiology and the combined scientific meeting of the E.C.V.O. and the E.S.V.O. Wien 2000*: 8.
17. Narfström K, Wallin-Håkansson B, Hertel E, Ekestén B. Familial retinopathy in Swedish Basenji dogs. Clinical and electrophysiological findings. En: *Proceedings of the 1st European Conference on the Veterinary Visual Electrophysiology and the combined scientific meeting of the E.C.V.O. and the E.S.V.O. Wien 2000*: 9.
18. Parry HB, Tansley K, Thompson LC. The electroretinogram of the dog. *J Physiol* 1953; 120: 28-40.

19. Narfström K, Wilen M, Andersson BE. Hereditary retinal dystrophy in the Briard dog: clinical and hereditary characteristics. *Vet Comp Ophthalmol* 1994; 2: 85-92.
20. Narfström K, Ekestén B. Diseases of the canine ocular fundus. En: *Veterinary Ophthalmology* 3rd edition. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia 1999: 887-908.
21. Narfström K, Ekestén B, Rosolen SG, Spiess BM, Percicot CL, Ofri R. Guidelines for clinical electroretinography in the dog. *Doc Ophthalmol* 2002; 105: 83-92.
22. Witzel DA, Joyce JR, Smith EL. Electroretinography of congenital night blindness in an Appaloosa filly. *J Equine Med Surg* 1977; 1: 226.
23. Loget O. Electrophysiologie sensorielle oculaire chez l'animal de laboratoire. Thèse pour le Doctorat vétérinaire. Nantes 1990.
24. Rosolen SG, Rigaudière F, Lachapelle P. A practical method to obtain reproducible binocular electroretinograms in dogs. *Doc Ophthalmol* 2002; 105: 93-103.
25. Ofri R. Clinical electrophysiology in *Veterinary Ophthalmology* –The past, present and future. *Doc Ophthalmol* 2002; 104: 5-16.
26. Millichamp NJ, Curtis R, Barnett KC. Progressive retinal atrophy in Tibetan Terriers. *J Am Vet Med Assoc* 1988; 192: 769.
27. Kommonen B, Raitta C. Electroretinography in Labrador Retrievers given ketamine-xylazine anesthesia. *Am J Vet Res* 1987; 48: 1325.
28. Aguirre GD, Rubin LF. Progressive retinal atrophy in the miniature poodle: an electrophysiologic study. *J Am Vet Med Assoc* 1972; 160: 191.

29. Williams DL. Ophthalmology. En: Mader DR (ed). Reptile medicine and surgery. W.B. Saunders Company. Philadelphia 1996: 175-185.
30. Underwood G. The eye. En: Gans C (ed). Biology of the Reptilia. Academic Press Inc. London & New York 1970; 2:1-97.
31. Capula, M. Guía de anfibios y reptiles. Ed. Grijalbo . Barcelona 1990: 168.
32. Bayón A, Albert A, Talavera J, Fernández del Palacio MJ. Electroretinografía en la iguana verde (*Iguana iguana*). Libro de Ponencias XXXV Congreso Nacional AVEPA. Madrid 2000: 324.
33. Miranda-Anaya M, Bartell PA, Menaker M. Circadian rhythm of iguana electroretinogram: Role of the Pineal. J Biol Rhythms 2000; 15:163-171.
34. Miranda-Anaya M, Bartell PA, Menaker M. Circadian rhythm of iguana electroretinogram: the role of dopamine and melatonin. J Biol Rhythms 2002; 17:526-38.
35. Fawcett DW, Bloom MD. El ojo. En: Fawcett DW, Bloom MD (ed). Tratado de histología. Interamericana Mc Graw-Hill, 12ª ed.1995: 971-991.
36. Rosolen SG, Lazard P, Isard PF, Rigaudière F. Electrophysiologie sensorielle visuelle: Rappels anatomo-fonctionnels. Société Française d'Etudes et de Recherches en Ophtalmologie Vétérinaires. 2000
37. Imbert M. Traitement rétinien de l'information visuelle. En: Risse JF (ed). Exploration de la fonction visuelle. Masson. Paris 1999:19-33.
38. Wheater, P.R; Burkitt, H.G; Daniels, V.G. Histología funcional. Ed. Jims. Barcelona 1987: 320-324.
39. Banks W.J. Histología Veterinaria Aplicada. Manual Moderno SA de CV. México DF 1986: 666.

40. Cohen, A.I. Vertebrate retinal cells and their organization. *Biol. Rev* 1963b; 38: 427-459.
41. Gallemore RP, Hughes BA, Miller SS. Retinal pigment epithelial transport mechanisms and their contributions to the electroretinogram. *Progress in Retinal and Eye Res* 1997; 16/4: 509-566.
42. Hicks D, Malecaze F. Physiologie de l'épithélium pigmentaire. *Encyclop Med Chir Ophtalmologie* 1992; 210-20-D30: 4p.
43. Edelman JL, Lin H, Miller S. Potassium-induced chloride secretion across the frog retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994; 266: C957-966.
44. Hughes BA, Shaikh A, Ahmad A. Effects of Ba²⁺ and Cs⁺ apical membrane K⁺ conductance in toad retinal pigment epithelium. *Am J Physiol* 1995; 268: C1164-1172.
45. Kenyon E, Yu K, la Cour M, et al. Lactate transport mechanism at the apical and basolateral membranes of bovine retinal pigment epithelium. *Am J Physiol* 1994; 267: C1561-1573.
46. Bialek S, Miller S. K⁺ and Cl⁻ transport mechanisms in bovine pigment epithelium that could modulate subretinal space volume and composition. *J Physiol* 1994; 475: 40-47.
47. Detwiler L. Studies on the retina. Photomechanical responses in the retina of *Eremias argus*. *J Exp Zool* 1923; 37: 89-99.
48. Laurens H, Detwiler SR. Studies on the retina. The structure of the retina of *Alligator mississippiensis* and its photomechanical changes. *J Exp Zool* 1921; 32: 207-234.

49. Vilter U. Valeur morphologique des photorécepteurs rétiniens chez la hatterie (*Sphenodon punctatus*). Cr Séanc Soc Biol 1951; 145: 20-23.
50. Underwood G. Reptilian retinas. Nature Lond 1951a; 167: 183-185.
51. Underwood G. Some suggestions concerning vertebrate visual cells. Vision Res 1968; 8: 483-488.
52. Underwood G. A contribution to the Classification of Snakes. Brit Mus Nat Hist. London. 1967a.
53. Walls GL. The vertebrate eye and its adaptative radiation. Bull Cranbrook Inst Sci 1942; 19: 1-785.
54. Doly M. Traitement rétinien de l'information visuelle. En: Risse JF (ed). Exploration de la fonction visuelle. Masson. Paris 1999: 11-17.
55. Lamb TD. Transduction in vertebrate photoreceptors: the roles of cyclic GMP and calcium. Trends Neurosci 1986; 9: 224-229.
56. Miller WH. Molecular mechanism of photoreceptor transduction. En: Current topics in membrane and transport 15. Bronner F, Kleinzeller A (eds). New York 1981.
57. Hurley JB. Molecular properties of the cGMP cascade of vertebrate photoreceptors. Ann Rev Physiol 1987; 49: 793-812.
58. Stein PJ, Rasenik MM, Bitensky MW. Biochemistry of the cyclic nucleotide-related enzymes in rod photoreceptors. En: Progress in retinal research 1. Osborne NN, Chader GJ (eds). Pergamon press. Oxford 1982: 227-243.
59. Nakatani K, Yau KW. Calcium and light adaptation in retinal rods and cones. Nature 1988; 334: 69-71.

60. Fatt P. Decline of the calcium hypothesis of visual transduction. *Nature* 1979; 280: 355-356.
61. Koch KW. Biochemical mechanism of light adaptation invertebrate photoreceptors. *Trends Biochem Sci* 1992; 17: 307-311.
62. Hagins WA, Penn RD, Yoshikami S. Dark current and photocurrent in retinal rods. *Biophys J* 1970; 10: 380-412.
63. Falk G. The transmission of rod signals to horizontal and bipolar cells. En: *Neurocircuitry of retina*. Gallego A, Gouras P (eds). Elsevier P. New York 1985: 34-50.
64. Jensen JR, Daw NW. Effects of dopaminergic agents on the activity of ganglion cells in the rabbit retina. En: *Dopaminergic mechanisms in vision*. Bodis-Wollner, Picolino M, Alan R (eds). I Liss. New York 1988: 31-40.
65. Osborne NN, Barnett NL, Ghazi H, et al. The neurobiology of the inner retina. En: *Osborne NN, Weiller R (eds)*. Springer Verlag. Paris 1989: 27-40.
66. Sterling P, Freed M, Smith RG. Microcircuitry and functional architecture of the cat retina. *Trends Neurosci* 1986; 9: 186-192.
67. Curcio CA, Allen KA, Sloan KR. Distribution and morphology of human cone photoreceptors stained with anti-blue opsin. *J Comp Neurol* 1991; 312: 610-624.
68. Delint PJ, Berendshot TTJM, Van Norren D. Local photoreceptor alignment measured with scanning laser ophthalmoscope. *Vision Res* 1997; 37/2: 243-248.
69. Curcio CA, Hendrickson AE. Organization and development of primate photoreceptor mosaic. En: *Osborne NN, Chader GJ. Progress in retinal Res* 1990b; 10: 89-120.

70. Baylor DA, Nunn BJ, Schnapf JL. Spectral sensitivity of cones of the monkey *Macaca fascicularis*. J Physiol 1987; 390: 145-160.

71. Bowmaker JK. Visual pigments and color vision in primates. En: From pigments to perception. Valberg AL, BB (eds). New York & London Plenum 1991: 1-10.

72. Dowling JE. The retina. An approachable part of the brain. Cambridge M & London: the Belknap press of Harvard. 1987.

73. Massey SC. Cell types using glutamate as a neurotransmitter in the vertebrate retina. Progress in Retinal Res 1990; 9: 399-425.

74. Calkins DJ, Tsukamoto Y, Streling P. Foveal cones from basal as well as invaginating junctions with diffuse on bipolar cells. Vis Res 1996; 36/21: 3373-3381.

75. Chun MH, Grüner U, Martin PR, et al. The synaptic complex of cones in the foveal and in the periphery of macaque monkey retina. Vis Res 1996; 36/21: 3383-3395.

76. Ramón y Cajal, S. Die Retina der Wirbelthiere. Bergmann. Wiesbaden 1894.

77. Pedler CH. Duplicity theory and microstructure of the retina. Rods and cones: a fresh approach. En: Ciba Foundation Symposium on Physiology and Experimental Psychology of Colour Vision. Wolstenholme CE, Knight J (eds). J & A Churchill. London 1965: 52-88.

78. Kolb H, Fernández E, Schouten J, et al. Are there three types of horizontal cell in the human retina?. J Comp Neurol 1994; 343: 370-386.

79. Dacey DM, Lee BB, Stafford DM, et al. Horizontal cells of the primate retina: Cone specific without opponency. *Science* 1996; 271: 656-658.

80. Ahnelt PK, Kolb H. Horizontal cells and cone photoreceptors in primate retina: a Golgi electron microscopic study of spectral connectivity. *J Comp Neurol* 1994; 343: 406-427.

81. Schwartz EA. Depolarization without calcium can release GABA from a retinal neuron. *Science* 1987: 350-355.

82. Kolb H, Nelson R. The organization of photoreceptor to bipolar synapses in the outer plexiform layer. En: Djamgoz M, Archer SN, Vallergera S (eds). *Neurobiology and Clinical Aspects of the Outer Retina*. Chapman and Hall. London 1995: 273-296.

83. Raviola E, Gilula NB. Intramembrane organization of specialized contacts in the outer plexiform layer of the retina. A freeze-fracture study in monkeys and rabbits. *J Cell Biol* 1975; 65: 192-222.

84. Mangel SC, Dowling JE. Responsiveness and receptive field size of carp horizontal cells are reduced by prolonged darkness and dopamine. *Science* 1985; 229: 1107-1109.

85. Piccolino M, Witkovsky P, Trimarchi C. Dopaminergic mechanisms underlying the reduction of electrical coupling between horizontal cells of the turtle retina induced by d-amphetamine, bicuculline and veratridine. *J Neurosci* 1987; 7: 2273-2284.

86. Tornqvist K, Yang XL, Dowling JE. Modulation of cone horizontal cells activity in the teleost fish retina. III. Effects of prolonged darkness and dopamine on electrical coupling between horizontal cells. *J Neurosci* 1988; 8: 2279-2888.

87. Famigletti EV, Kolb H. Structural basis for ON and OFF center responses in retinal ganglion cells. *Science* 1976; 194: 193-195.
88. Nawy S, Jahr CE. Suppression by glutamate of cGMP activated conductance in retinal bipolar cells. *Nature* 1990; 346: 269-271.
89. Kolb H, Linberg KA, Fisher SK. The neurons of the human retina: A Golgi study. *J Comp Neurol* 1992; 318: 147-187.
90. Mariani AP. Amacrine cells of the rhesus monkey retina. *J Comp Neurol* 1990; 301: 382-400.
91. Morgan IG. What do amacrine cells do?. En: Osborne NN, Chader GJ. *Progress in retinal Res* 1991; 11: 193-214.
92. Pourcho RG, Goebel DJ. Neuronal subpopulations in cat retina which accumulate the GABA agonist (3H) muscimol: a combined Golgi and autoradiographic study. *J Comp Neurol* 1983; 219: 25-35.
93. Vardi N, Smith RG. The All amacrine network: coupling can increase correlated activity. *Vis Res* 1996; 36/23: 3743-3757.
94. Boycott BB, Wässle H. The morphological types of ganglion cells of the domestic cat's retina. *J Physiol* 1974; 240: 397-419.
95. Perry VR, Oehler R, Cowey A. Retinal ganglion cells that project to the dorsal lateral geniculate nucleus in the macaque monkey. *Neuroscience* 1984; 12: 1110-1123.
96. Dacey DM, Lee BB. The blue-ON opponent pathway in primate retina originates from a distinct bistratified ganglion cell type. *Nature* 1994; 367: 731-735.

97. Pedler CH, Tilly R. The radial fibres of the reptilian retina. *J Anat* 1963; 97: 626-627.
98. Kuffler SW. Discharge patterns and functional organization of mammalian retina. *J Neurophysiol* 1953; 16: 37-68.
99. Enroth-Cugel C, Robson JG. The contrast sensitivity of retinal ganglion cells of the cat. *J Physiol* 1966; 187: 551-578.
100. Rodieck RW. Receptive field of the cat's retina: a new type. *Science* 1967; 157: 90-92.
101. Kolb H. The organization of the outer plexiform layer in the retina of the cat: electromicroscopic observations. *J Neurocytol* 1977; 6: 131-153.
102. Distler C, Dreher Z. Glia cells of monkey retina-II. Müller cells. *Vis Res* 1996; 36/16: 2381-2394.
103. Newman EA. Regulation of extra-cellular potassium by glial cells in the retina. *Trends Neuro* 1985; 8: 156-159.
104. Mollon ID, Bowmaker JK. The spatial arrangement of cones in the primate fovea. *Nature* 1992 ; 360: 677-679.
105. Walls GL. The vertebrate eye and its adaptive radiation. *Bull Cranbrook Inst Sci* 1942; 19: 1-785.
106. Pettigrew JD, Wallman J, Wildsoet CF. Saccadic oscillations facilitate ocular perfusion from the avian pecten. *Nature* 1990: 343-362.
107. Armstrong JA. An experimental study of the visual pathways in a reptile (*Lacerta vivipara*). *J Anat* 1950; 84: 146-167.

108. Armstrong JA. An experimental study of the visual pathways in a snake (*Natrix natrix*). *J Anat* 1951; 85: 275-288.
109. Lescure, F. Electrophysiologie oculaire. L'Encyclopédie Vétérinaire. Editions Techniques. Paris 1992; 1700: 1-13.
110. Komáromy AM, Brooks DE, Dawson WW, Källberg ME, Ollivier FJ, Ofri R. Technical issues in electrodiagnostic recording. *Vet Ophthalmol* 2002; 5: 85-91.
111. Marmor MF, Zrenner E. Standard for clinical electroretinography (1999 update). *Doc Ophthalmol* 1999; 97: 143-156.
112. Narfström K, Ekesten B, Rosolen SG, Spiess BM, Percicot CL, Ofri R. Recommendations for a harmonized ERG protocol. En: Proceedings of the 1st European Conference on the Veterinary Visual Electrophysiology and the combined scientific meeting of the E.C.V.O. and the E.S.V.O. Wien 2000: 21-25.
113. Narfström K. Electroretinography in veterinary medicine –easy or accurate?. *Vet Ophthalmol* 2002; 5: 249-251.
114. Hood DC, Finkelstein MA. Sensitivity to light. En: Boff KR, Kaufman LR, Thomas JP (eds). *Handbook of Perception and Human Performance*. Wiley. New York 1986.
115. Jacobs GH. The distribution and nature of colour vision among the mammals. *Biol Rev* 1993; 68: 413-471.
116. Rosolen S.G, Lazard P, Saint-Macary G, et al. New sclero-conjunctival electrodes for ERG recordings on dog. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; 39, S187.

117. Kommonen B, Kylmä T, Karhunen U, Dawson WW, Penn JS. Impaired retinal function in young Labrador retriever dogs heterozygous for late onset rod cone degeneration. *Vision Res* 1997; 37: 365-370.
118. Howard DR, Sawyer DC. Electroretinography of acute hypoxic and increased intraocular pressure status in the dog. *Am J Vet Res* 1975; 36:81.
119. Johnson MA, Massof RW. The photomyoclonic reflex: an artefact in the clinical electroretinogram. *Br J Ophthalmol* 1981; 66: 368-372.
120. Coulter DB, Martin CL. Signal averaging of electroretinograms. *Ga Vet* 1978; 30: 14.
121. Einthoven W, Jolly WA. The form and magnitude of the electrical response of the eye to stimulation by light at various intensities. *Q J Exp Physiol* 1908; 1: 373-416.
122. Creel D. <http://www.webvision.med.utah.edu/ClinicalERG.html>. Última consulta: 30/11/2004.
123. Carr RE, Siegel IM. Visual electrodiagnosing testing. Williams & Wilkins. Baltimore 1982: 24.
124. Lei B, Perlman I. The contribution of voltage and time dependent potassium conductances to the electroretinogram in rabbits. *Vis Neurosci* 1999; 16: 743-754.
125. Dong CJ, Hare WA. Contribution to the kinetics and amplitude of the electroretinogram b-wave by third order retinal neurons in the rabbit retina. *Vis Res* 2000; 40: 579-589.
126. Dawson WW, Kommonen B. The late positive retinal potential in dogs. *Exp Eye Res* 1995; 60: 173.

127. Asi H, Perlman I. The relationships between the ERG a-wave, b-wave and oscillatory potentials and their application to clinical diagnosis. *Doc Ophthalmol* 1992; 79: 125-139.
128. Gouras P. Electroretinography: Some basic principles. *Invest Ophthalmol* 1970; 9: 557-69.
129. Severin GA. Severin's veterinary ophthalmology notes. 3rd ed. *Veterinary Ophthalmology Notes*. FT. Collins. Colorado 1995.
130. Sandberg Ma, Pawlyk BS, Berson EL. Full field electroretinograms in Miniatura Poodles with progressive rod-cone degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1986; 27: 1179.
131. Acland GM, et al. A new early onset inherited retinal degeneration in Norwegian Elkhound. *Trans Am Coll Vet Ophthalmol* 1983; 14: 98.
132. O'Toole D, Roberts S. Generalized progressive retinal atrophy in two Akita dogs. *Vet Pathol* 1984; 21: 457.
133. Acland GM, Aguirre GD. Retinal degenerations in the dog: Early retinal degeneration (erd) in Norwegian Elkhounds. *Exp Eye Res* 1987; 44: 491-521.
134. Clements PJM, Sargan DR, Gould DJ, Petersen-Jones SM. Recent advances in understanding the spectrum of canine generalised progressive retinal atrophy. *J Sm Anim Pract* 1996; 37: 155-162.
135. Narfström K, Ekesten B. Electroretinographic evaluation of Papillons with and without hereditary retinal degeneration. *Am J Vet Res* 1998; 59: 221-226.
136. Parshall CJ, Wyman M, Nitroy S, Acland GM, Aguirre GD. Photoreceptor dysplasia: an inherited progressive retinal atrophy of miniatura schnauzer dogs. *Prog Vet Comp Ophthalmol* 1991; 1: 187-203.

137. Narfström K, Wrigstad A, Ekestén B, Nilssön SEG. Hereditary retinal dystrophy in the Briard dog: clinical and hereditary characteristics. *Vet Comp Ophthalmol* 1994; 4: 85-92.
138. Nilssön SEG, Wrigstad A, Narfström K. Changes in the DC electroretinogram in Briard dogs with hereditary congenital night blindness and partial day blindness. *Exp Eye Res* 1992; 54: 291.
139. Narfström K, Arden GB, Nilssön SEG. Retinal sensitivity in hereditary retinal degeneration in Abyssinian cats: electrophysiological similarities between man and cat. *Br J Ophthalmol* 1989; 73: 516.
140. Leon A, Hussain AA, Curtis R. Autosomal dominant rod-cone dysplasia in the Rdy Cat 2. Electrophysiological findings. *Exp Eye Res* 1991; 53: 489.
141. Narfström K. Progressive retinal atrophy in the Abyssinian cat. Clinical characteristics. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1985; 26: 193-200.
142. Narfström K, Nilssön SEG, Andersson BE. Progressive retinal atrophy in the Abyssinian cat: Studies of the DC-recorded electroretinogram and the standing potential of the eye. *Br J Ophthalmol* 1985; 69: 618-623.
143. Venter IJ, Petrick SW. Akute blindheid in 'n hond veroorsaak deur skielike verworwe retinale degenerasie. *Tydskr S Afr Vet Ver* 1995; 66: 32-34.
144. O'Toole D, Roberts S, Nunamaker C. Sudden acquired retinal degeneration ('silent retina syndrome') in two dogs. *Vet Record* 1992; 130: 157-161.
145. Riis RC, Cummings JF, Loew ER, De Lahunta A. Tibetan terrier model of canine ceroid lipofuscinosis. *Am J Med Genet* 1992; 42: 615-621.

146. Wrigstad A, Nilsson SEG, Dubielzig R, Narfström K. Neuronal ceroid lipofuscinosis in the Polish owczarek nizinni (PON) dog. A retinal study. *Doc Ophthalmol* 1995; 91: 33-47.
147. Rubin LF. Clinical electroretinography in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1967; 151:1456.
148. Rubin LF, Bourns TKD, Lord H. Hemeralopia in dogs: heredity of hemeralopia in Alaskan Malamutes. *Am J Vet Res* 1967; 28:355.
149. Gum, G.G. Electrophysiology in veterinary ophthalmology. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1980; 10:437.
150. Jones RD, et al. An electroretinogram protocol for toxicological screening in the canine model. *Toxicol Lett* 1994; 223.
151. Sato S. Toxic effects on the visual system of diaminophenoxybutone, quinina and ethambutol in conscious dog. *Appl Tox* 1985; 5: 777-784.
152. Schmidt SY, Berson EL, Hayes KC. Retinal degeneration in cats fed casein. I. Taurine deficiency and ERG amplitudes. *Invest Ophthalmol* 1976; 15: 47-52.
153. Schmidt SY, Berson EL, Watson G, Huang C. Retinal degeneration in cats fed casein. III. Taurine deficiency and ERG amplitudes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1977; 16: 673-678.
154. Berson EL, Watson G, Grasse KL, Szamier RB. Retinal degeneration in cats fed casein. IV. The early receptor potential. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1981; 21: 345-350.
155. Witzel, D.A; Johnson, J.H; Pitts, D.G; Smith, E.L III. Scleral contact lens electrodes for electroretinography in domesticated animals. *Am. J. Vet. Res.* 1976; 37:983.

156. Witzel DA, Smith III EL, Wilson RD, Aguirre GD. Congenital stationary night blindness: an animal model. Invest Ophthalmol Vis Sci 1978; 17: 788-795.

157. Mertel L, de Gresti A, Boniperti E, Seguso L. Functional Evaluation of three Appaloosa horses with congenital stationary night blindness (CSNB). En: Proceedings of the 1st European Conference on the Veterinary Visual Electrophysiology and the combined scientific meeting of the E.C.V.O. and the E.S.V.O. Wien 2000: 6.

158. Johnson MA, M^c Phee TJ. Electroretinographic findings in iris neovascularization due to acute central retinal vein occlusion. Arch. Ophthalmol 1993; 111: 806-814.

159. Severns ML, Johnson MA, M^c Phee TJ. Predicting outcome in central retinal vein occlusion using the flicker electroretinogram. Arch Ophthalmol 1993; 111: 1123-1130.

160. Fujino T, Hamasaki DI. The effect of occluding the retinal and choroidal circulation on the electroretinogram of monkeys. J Physiol 1965; 180: 837-845.

161. Barten SL. Lizards. En: Mader DR (ed). Reptile medicine and surgery. W.B. Saunders Company. Philadelphia 1996: 47-61.

162. McKeown S. General Husbandry and Management. En: Mader DR (ed). Reptile medicine and surgery. W.B. Saunders Company. Philadelphia 1996: 9-19.

163. Divers SJ, Redmayne G, Aves EK. Haematological and biochemical values of 10 green iguanas (*Iguana iguana*). Vet Rec 1996 ; 138: 203-205.

164. Divers SJ, Stahl SJ, Stedman NL, Hernandez-Divers SM, Schumacher J, Hanley CS, Wilson H, Vidyashankar AN, Zhao Y, Rumbelha WK. Renal evaluation in the healthy green iguana (*Iguana iguana*): Assessment of plasma

biochemistry, glomerular filtration rate and endoscopic biopsy. *J Zoo Wild Med* 2004; 36: 155-168.

165. Rosolen SG, Gaidon JA, Desbrosse AM, et al. Diagnóstico. En: Pfeiffer RL, Petersen-Jones SM (eds). *Oftalmología de pequeños animales*. Harcourt Saunders. Madrid 2002: 13-41.

166. Kern TJ. Exotic animal ophthalmology. En: Gelatt K (ed). *Veterinary Ophthalmology*. Lea and Febiger. Philadelphia 1991: 1273-1306.

167. David LW. Ophthalmology. En: Mader DR (ed). *Reptile Medicine and Surgery*. WB Saunders Company. Philadelphia 1996; 175-185.

168. Heard DJ. Advances in reptile anesthesia. *Proc North Am Vet Conf* 1999: 770.

169. Kommonen B. The DC-recorded dog electroretinogram in ketamine-medetomidine anesthesia. *Acta Vet Scand* 1988; 29: 35.

170. Martínez-gonzález MA, de Irala Jokin, Faulin Fajardo FJ (eds). *Bioestadística amigable*. Díaz de Santos. Madrid 2001.

171. Sagarminaga JL. *Biometría ocular mediante ultrasonografía en aves rapaces*. Tesis Doctoral. Murcia septiembre 2005.

172. Albert Soriano AP. *Ecocardiografía bidimensional y doppler en la iguana verde (Iguana iguana)*. Tesis Doctoral. Murcia diciembre 2003.

173. Galibert F, André C, Chéron A, et al. Intérêt du modèle canin pour la génétique médicale. *Bull Acad Nat Méd* 1998; 4: 811-822.

174. Massopust LC, Wolin LR, Albin MW, Meder J. Evoked responses from the eye and visual pathways in the hypothermic cat. *Expl Neurol* 1964; 10: 383-392.

175. Berson EL. Fenómenos eléctricos de la retina. En: Hart WM Jr. (ed). Fisiología del ojo. Mosby-Doyma Libros. División de Times Mirror de España S.A. Madrid 1994: 645-711.
176. Sato S, Sugimoto S, Chiba S. A procedure for recording electroretinogram and visual evoked potential in conscious dogs. J Pharmacol Methods 1982, 8: 173.
177. Imai R, et al. A procedure for recording electroretinogram and visual evoked potential in freely moving cats. J Toxicol Sci 1990; 15: 263.
178. Mosley CAE. Anesthesia and analgesia in reptiles. Sem Av Exot Pet Med 2005; 14: 243-262.
179. Lierz M. Avian renal disease: pathogenesis, diagnosis and therapy. Vet Clin Exot Anim 2003; 6: 29-55.
180. Dantzler WH. Comparative physiology of the vertebrate kidney. Springer-Verlag. Berlin 1989.
181. Beck K, Loomis M, Lewbart GL, et al. Preliminary comparison of plasma concentrations of gentamicin injected into the cranial and caudal limb musculature of the eastern box turtle (*Terrapene carolina carolina*). J Zoo Wildl Med 1995; 26: 265-268.
182. Holz P, Barker IK, Burger JP, et al. The effect of the renal portal system on pharmacokinetic parameters in the red-eared slider (*Trachemys scripta elegans*). J Zoo Wildl Med 1997; 28: 386-393.
183. Holz P, Burger JP, Pasloske K, et al. Effect of injection site on carbenicillin pharmacokinetics in the carpet python (*Morelia spilota*). J Herp Med Surg 2002; 12: 12-16.

184. Sykes JM, Greenacre CB. Techniques in drug delivery in reptiles and amphibians. J Exot Pet Med 2006; 15: 210-217.

185. Bennett AF, Dawson WR. Metabolism. En: Gans C (ed). Biology of the Reptilia. Vol 5. San Diego. Academic Press Inc. San Diego 1976; 5.

186. Grace MS, M^c Mahon S. Circadian rhythms in reptiles and amphibians. Libro de Ponencias XI ARAV Annual Conference. Naples 2004: 77-83.

187. Scope A, Frommlet F, Schwendenwein I. Circadian and seasonal variability and influence of sex and race on eight clinical chemistry parameters in budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). Res Vet Sci 2005; 78: 85-91.

188. Savory CJ, Kostal L, Nevison IM. Circadian variation in heart rate, blood pressure, body temperature and EEG of immature broiler breeder chickens in restricted-fed and *ad libitum*-fed states. Br Poult Sci 2006; 47: 599-606.

189. Del Sole MJ, Sande PH, Bernades JM, Aba MA, Rosenstein RE. Circadian rhythm of intraocular pressure in cats. Vet Ophthalmol 2007; 10: 155-161.

190. Mishina M, Watanabe N, Watanabe T. Diurnal variations of blood pressure in cats. J Vet Med Sci 2006; 68: 243-248.

191. Greppi GF, Casini L, Gatta D, Orlandi M, Pasquini M. Daily fluctuations of haematology and blood biochemistry in horses fed varying levels of protein. Equine Vet J 1996; 28: 350-353.

192. Hoh WP, Oh TH. Circadian variations of serum thyroxine, free thyroxine and 3,5,3'triiodothyronine concentrations in healthy dogs. J Vet Sci 2006; 7: 25-29.

193. Hartley C, Williams DL, Adams VJ. Effect of age, gender, weight and time of day on tear production in normal dogs. Vet Ophthalmol 2006; 9: 53-57.

194. Yamazaki S, Mizuno M, Sasaki M. Relationships between bilateral circadian pacemakers in intact and neurally separated optic-lobes of a carabid beetle. *Appl Entomol Zool* 1995; 30: 537-542.
195. M^c Mahon DG, Barlow RB. Visual responses in teleosts, electroretinograms, eye movements and circadian rhythms. *J Genet Physiol* 1992; 100: 155-169.
196. Manglapus MK, Uchiyama H, Buelow NF, Barlow RB. Circadian rhythms of rod-cone dominance in the japanese quail retina. *J Neurosci* 1998; 18: 4775-4784.
197. Brandeburg I, Bobbert AC, Eggelmeyer F. Evidence for the existence of a retino-hypothalamo-retinal loop in rabbits. *Int J Chronobiol* 1981; 8: 13-29.