



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**MAESTRIA EN CIENCIAS
DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

**“ESTUDIO CLÍNICO, HISTOLÓGICO Y DE PATRÓN DE
DISTRIBUCIÓN DE LAS METALOPROTEINASAS (MMP-2, MMP-9) Y
SUS INHIBIDORES TISULARES (ITMP-1 Y ITMP-2) EN LA VESÍCULA
DE FILTRACIÓN ASOCIADA A LA IMPLANTACIÓN DE VÁLVULA
TIPO
AHMED (AGV-S2) EN EL PERRO”**

**T E S I S
PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A
EVA MARIA ABARCA PIEDRAFITA**

TUTOR: GUSTAVO A. GARCÍA SÁNCHEZ

COMITÉ TUTORAL: NORMA MORENO MENDOZA

SARA CABALLERO CHACÓN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ÍNDICE

I Resumen	1
II Abstract.....	1
III Introducción.....	4
1. Glaucoma.....	4
<i>Definición e importancia</i>	<i>4</i>
<i>Patogenia del glaucoma</i>	<i>5</i>
i) <i>Mecanismos de incremento de la PIO.....</i>	<i>6</i>
ii) <i>Mecanismos de muerte celular.....</i>	<i>7</i>
2. Cirugía filtrante	9
<i>Válvula de Ahmed.....</i>	<i>11</i>
i) <i>Dinámica de fluidos.....</i>	<i>13</i>
<i>Complicaciones.....</i>	<i>14</i>
3. Vesícula filtrante.....	17
<i>Histología.....</i>	<i>19</i>
i) <i>Histología conjuntival bulbar.....</i>	<i>19</i>
ii) <i>Histología de la vesicula filtrante.....</i>	<i>20</i>
4.Metaloproteinasas.....	21
<i>Proceso cicatricial y mediadores moleculares</i>	<i>23</i>
<i>MMP-gelatinasas</i>	<i>24</i>
IV. Justificación.....	25
V. Hipótesis.....	26

VI. Objetivos.....	26
VII. Material y métodos	27
VIII. Resultados	34
<i>Parámetros clínicos de glaucoma.....</i>	<i>34</i>
<i>Evaluación clínica de la vesícula filtrante.....</i>	<i>40</i>
<i>Histología.....</i>	<i>45</i>
<i>Inmunohistoquímica.....</i>	<i>51</i>
IX. Discusión.....	58
X. Conclusiones	65
XI. Abreviaturas	66
XII. Bibliografía	67

Dedicatorias;

Este trabajo esta dedicado a mis padres Jorge y Soledad; mi hermana Marisol, mi cuñado Jesus; y mis tíos Montse y Ángel por su ayuda y apoyo en esta aventura. A mi compañero en esta vida, por saber entenderme, apoyarme y darme la tranquilidad cuando más la necesité.

A través de estas líneas quería agradecer el apoyo de todas las personas que me ayudaron en la realización de este trabajo.

A mi mentor el Dr. Gustavo Adolfo García Sánchez

A la Dra. Norma Moreno del Instituto de Investigaciones de Biomédicas por su apoyo en la obtención de los anticuerpos y en la realización de los estudios de inmunohistoquímica.

A Esmeralda Lira por ser una maravillosa “compañera” que me guió por el laboratorio.

Al Dr. Aberlardo Rodriguez y todo el Servicio de Patología Ocular de la Asociación para Evitar la Ceguera en México, por su ayuda en la realización de los cortes histológicos, la evaluación histológica de la muestras, su disposición y su amabilidad.

A la Dra. Sara Chacón por sus críticas y comentarios.

A la Dra. Adriana Ducoing por su ayuda en el análisis estadístico.

A mis compañeras; Magda Gómez, Lorena Garza, Uxue Fernández y Paloma Ricarte por su apoyo incondicional.

A todo el personal de Oftalvet.

A Luz Ramírez y Enrique Rangel por ser mis amigos en un país extranjero.

Al Dr. Juarez García y la Sra. Soqui por darme un “hogar”.

I. Resumen

La principal causa de complicación tardía en la cirugía filtrante en el perro, es la formación de una vesícula filtrante encapsulada por la fibrosis post-operatoria. El propósito de este trabajo es caracterizar la expresión de las metaloproteinasas MMP-2, 9 y de sus inhibidores tisulares ITMP-1, 2 en las vesículas encapsuladas, vesículas con dehiscencia y en vesículas funcionales. Además se describe los hallazgos histopatológicos de los distintos tipos de vesículas filtrantes. La población estudiada consistió en 10 especímenes de vesículas encapsuladas, 5 de vesículas con dehiscencia, 2 vesículas funcionales y 5 muestras de conjuntiva de perros sanos. Se realizó un estudio de inmunohistoquímica para determinar la distribución de MMP-2, 9 y ITMP-1 y 2 en cada vesícula. Los resultados de inmunohistoquímica se correlacionaron con los hallazgos histopatológicos.

Resultados: se observaron dos zonas bien definidas en las vesículas encapsuladas. Una fibroproliferativa externa y una fibrótica interna, caracterizada por una disposición de las fibras de colágeno densas y paralelas. La inmunoreactividad de MMP-9 en la capa fibrótica de las vesículas encapsuladas fue intensa y estadísticamente significativa respecto al resto de vesículas filtrante. Como conclusión, se encontró una actividad fibroblástica incrementada en la capa fibrótica de las vesículas encapsuladas. Se encontró una inmunoreactividad intensa de MMP-9 en la vesícula encapsulada comparada con la vesícula con dehiscencia y la funcional. Este patrón de expresión puede representar una alteración del equilibrio entre la expresión MMP y ITMP la cual es una de las vías esenciales de renovación del colágeno

II Abstract

Excessive postoperative scarring with the formation of encapsulated filtering blebs remains the major reason for gonioimplant failure. The purpose of this study is to characterize the expression of matrix metalloproteinases MMP-2, 9 and their tissue inhibitors TIMPS-1, 2 in encapsulated filtering blebs, leaking filtering blebs and functional filtering blebs and to correlate this expression with the histologic features observed. Eleven eyes with encapsulated filtering bleb, 5 eyes with leaking filtering blebs and two eyes with functional filtering blebs following Ahmed valve implantation were studied. Immunohistochemistry was performed to determine the distribution of MMP-2, 9 and TIMP-1, 2 in each bleb. The immunohistochemical staining was correlated with the histologic features observed in H&E and Masson's trichrome stained sections and immunoreactivity was compared with normal conjunctiva N=5. Results; histologic study showed two specific zones, an outer fibroproliferative zone characterized by collagen deposition, the presence of fibroblasts and capillaries, and an inner fibrotic zone with collagen fibers densely and uniformly parallel oriented. Immunoreactivity for MMP-9 was significantly higher in the fibrotic layer than in normal conjunctiva. In addition, positive staining was found for MMP-2 and TIMP-2 but was not significantly different from that of the control tissue. As conclusions; an increased fibroblastic activity on the inner fibrotic layer associated to an overexpression of MMP-9 was observed. This pattern of expression may represent a dysregulation between MMP and TIMP expression and is thought to be a critical pathway mediating collagen breakdown, which could potentially lead to bleb failure.

III. Introducción

Importancia clínica del glaucoma

El glaucoma se define como una enfermedad neuro-degenerativa con la presencia de una neuropatía óptica compleja y multifactorial caracterizada por una pérdida progresiva de las células ganglionares retinianas y sus axones, conduciendo a una reducción del grosor de la capa de fibras nerviosas retinianas (Brooks, 1999).

El glaucoma primario es la segunda causa mundial de ceguera en humanos afectando a más de 65 millones de personas con una incidencia del 2% (Quigley, 2006). En Medicina Veterinaria, el glaucoma primario en el perro se ha descrito en 41 razas, siendo el Cocker Spaniel la raza que presenta la mayor prevalencia de la enfermedad (1.7%) (Gelatt 2007).

La definición de glaucoma ha cambiado a lo largo del tiempo, actualmente, el glaucoma no se define como una sola enfermedad sino que se habla de “glaucomas” y se debe considerar como un gran conjunto de desordenes que tienen en común el daño selectivo de las células ganglionares de la retina y como factor de riesgo más importante, el aumento de la presión intraocular (Dubielzig, 2010). De hecho, actualmente el único factor tratable en este síndrome es la presión intraocular y se ha demostrado que el control de la misma limita el daño sobre el nervio óptico y por lo tanto, mantiene la visión de forma más prolongada (Agis, 2000) (Heijil, 2000).

Patogenia del glaucoma:

i) Mecanismos de aumento de la presión intraocular (PIO)

La presión intraocular (PIO) se mantiene gracias al equilibrio existente entre la producción del humor acuoso y su drenaje (Figura 1). La PIO considerada normal en el perro es de 16.8 ± 4.0 mmHg. El humor acuoso se produce en el epitelio no pigmentado de los procesos ciliares gracias a una combinación de mecanismos incluyendo la difusión pasiva, ultrafiltración y la secreción activa (Gelatt, 2007).

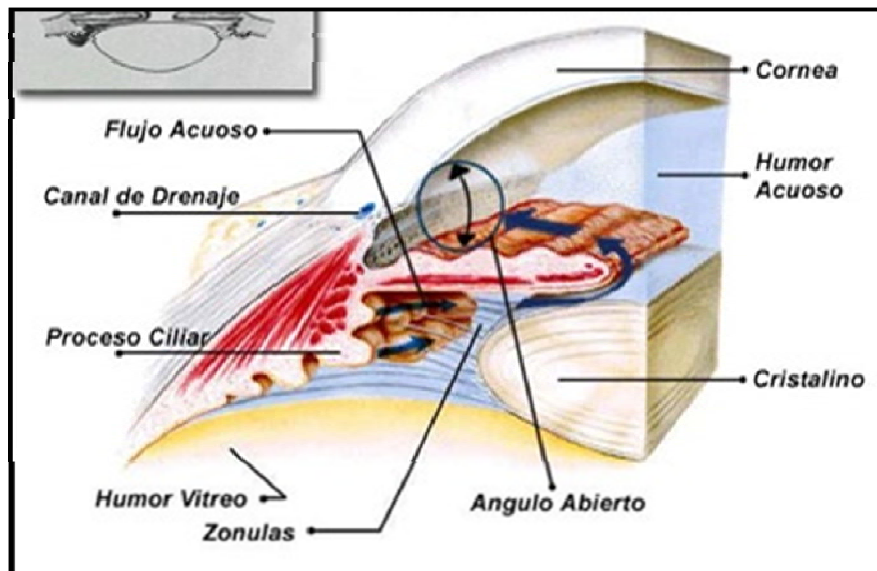


Figura 1. Estructura anatómica del ángulo irido-corneal. Las flechas azules indican la vía de drenaje del humor acuoso y se observan las estructuras implicadas. <http://picses.eu/domain/clinicaofta.com>

La vía de drenaje se divide en convencional localizada en el ángulo iridocorneal a través del ligamento pectíneo y la no convencional o uveo-escleral. En la vía convencional el humor acuoso pasa a través de distintas estructuras;

ligamento pectíneo, hendidura ciliar, malla trabecular uveal y malla trabecular corneo-escleral para ser recolectado en el plexo acuoso angular y finalmente drenarse a través de plexo intraescleral.(Figura 2) Esta vía de drenaje es sensitiva a la presión, es decir depende de la PIO y en el perro representa el 85-90% del drenaje del humor acuoso.

En la vía no convencional o uveo-escleral, el humor acuoso, es drenado a través de la malla trabecular uveal y posterior espacio supracoroideo, esta vía es independiente de la PIO (Gelatt, 2007).

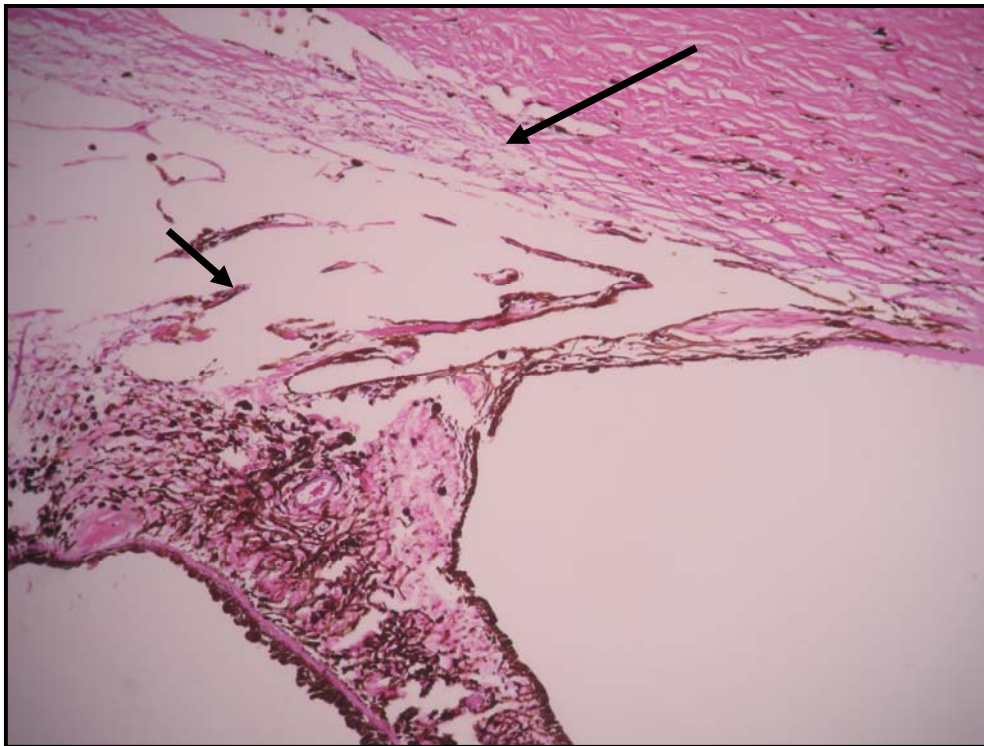


Figura 2. Fotomicrografía de un corte histológico del ángulo iridocorneal en el perro. Se observa la situación anatómica de la malla trabecular uveal (flecha corta) y de la malla trabecular corneoescleral (flecha larga). H-E, 40X .

Los mecanismos principales relacionados con el aumento de la PIO son: a) Incremento en la presión venosa episcleral por ejemplo, afecciones con efecto masa en espacio retrobulbar o aumento de la presión sobre la vena yugular y b) la reducción en el drenaje del humor acuoso. Dentro de este grupo se encuentran las causas primarias y secundarias. Primaria (goniodisgénesis); debido a una anomalía en la vía de drenaje como displasia del ligamento pectíneo o disgenesia mesodérmica. La goniodisgénesis, se define como una densa capa de tejido mesodérmico, desde la base del iris hasta la membrana de Descemet, la cual se encuentra distorsionada. Secundaria (como complicación de otro proceso): uveítis, sinequia, membranas fibrovasculares o bloqueo pupilar (Dubielzig, 2010).

ii) Mecanismos de muerte celular (células ganglionares y fotorreceptores)

La neuropatía glaucomatosa se ha asociado a apoptosis tanto en estudios *post-mortem* en personas como en estudios efectuados en modelos animales experimentales de glaucoma. Los distintos mecanismos implicados en la apoptosis de las células ganglionares son; privación de factores neurotróficos a nivel de la lamina cribosa (Brooks, 1999) así como isquemia, alteración del metabolismo del óxido nítrico, elevación del glutamato, depleción de taurina, estrés oxidativo y mecanismos de reacciones inmunomediadas en las que se han descrito moléculas como la rodopsina y las proteínas de choque térmico hsp60 y hsp 27 (Tadashi, 2006).

Además se han descrito alteraciones en el drenaje del humor acuoso por alteraciones en los glicosaminoglicanos o matriz extracelular en la malla trabecular

del ángulo iridocorneal (Garcia, 1998). De hecho recientemente se ha podido demostrar que en perros que sufren glaucoma existe un aumento en la presencia de la metaloproteinasa MMP-2 y MMP-9 en el humor acuoso y en la base del iris, componente estructural del ángulo iridocorneal (Weinstein, 2007).

En el perro, a diferencia de otras especies, el daño glaucomatoso en la retina, no afecta solo a la retina interna (células ganglionares) sino que también se observan lesiones en la externa (fotorreceptores) llegando a encontrarse necrosis, gliosis y posterior atrofia de la retina (Dubielzig, 2010).

El glaucoma es una enfermedad progresiva, multifactorial y actualmente definida como neurodegenerativa. En el paciente humano después de la primera crisis de glaucoma la enfermedad progresa hasta la ceguera en un periodo de 15 años lo que representa el 18% de periodo de vida media en humanos, sin embargo en el perro, la ceguera se presenta al año de la primera crisis, lo que representa el 6% del periodo de vida media del perro (Ahmed, 2008). Existen varios factores de riesgo para el glaucoma entre ellos destacan, el aumento de la presión intraocular (PIO), edad avanzada, raza, historia familiar y predisposición genética. Sin embargo, en la actualidad el único factor que se puede intentar controlar es la presión intraocular, por lo que el tratamiento del glaucoma se sigue centrando en el control de la misma (Sherwood, 2006). Además, recientemente se ha introducido el concepto de presión intraocular meta, que es la presión necesaria para que un paciente en particular de glaucoma no siga sufriendo avances en la neuropatía glaucomatosa. En muchos casos, se ha descrito en los niveles normales bajos del margen fisiológico (AGIS, 2000).

2. Cirugía filtrante

El tratamiento actual del glaucoma primario en el perro consiste en el uso de drogas hipotensoras, asociado a tratamiento quirúrgico cuando el nivel de presión intraocular supera los niveles deseables o aparecen efectos secundarios sistémicos asociados a la aplicación de las drogas hipotensoras (Gelatt, 1998). Existen líneas de trabajo en glaucoma que apuestan por un tratamiento quirúrgico precoz como el factor de mayor importancia para mantener la PIO en niveles adecuados y la visión durante más tiempo (Cook, 1997).

Existen dos tipos de estrategias quirúrgicas en el tratamiento del glaucoma en el perro; la primera son las técnicas que se basan en la disminución en la formación del humor acuoso como la ciclofotocoagulación con láser por vía transescleral o la más recientemente descrita endoláser. La segunda estrategia son las llamadas técnicas de filtración en las que se consigue aumentar el rango de humor acuoso drenado. En este grupo encontramos la trabeculectomía y la implantación de un gonioimplante en la cámara anterior (Gelatt, 2007).

El objetivo de una técnica filtrante, es crear una comunicación de paso de humor acuoso entre la cámara anterior y el espacio subconjuntival formando un espacio o vesícula filtrante (Jones, 2008).

El primer diseño de gonioimplante descrito en medicina humana por Rollet en 1904, consistió en la implantación de un pelo de caballo entre la cámara anterior y el tejido subconjuntival y el primer caso descrito en el perro se remonta a 1942 con la inserción en el limbo del canalículo lagrimal (Ahmed, 2008).

El gonioimplante más usado en medicina veterinaria es el gonioimplante tipo Ahmed, valvulado con flujo unidireccional. (García, 1998) y recientemente se aplica de forma combinada a la ciclotocoagulación (Sapienza, 2005) (Bentley, 1999).

Sin embargo, el gonioimplante tipo Ahmed, se ha asociado a distintas complicaciones tanto en medicina humana como en medicina veterinaria, sobretodo en el caso de glaucomas con origen inflamatorio lo que ha creado en medicina veterinaria una controversia respecto a su eficacia a largo plazo en el perro (Sapienza, 2005).

Válvula de Ahmed

La válvula de Ahmed, es un implante formado por un tubo de silicona unido a una plataforma también de silicona en la actualidad. Es una válvula de flujo unidireccional, no obstructiva y autoregulada de tipo valvulado (Figura 3).

En el diseño original la plataforma estaba construida con polipropileno, sin embargo Ayyala en 2007 demostró que la silicona era un material más biocompatible con lo que el prototipo sufrió ese cambio (Ayyala et al., 2000).

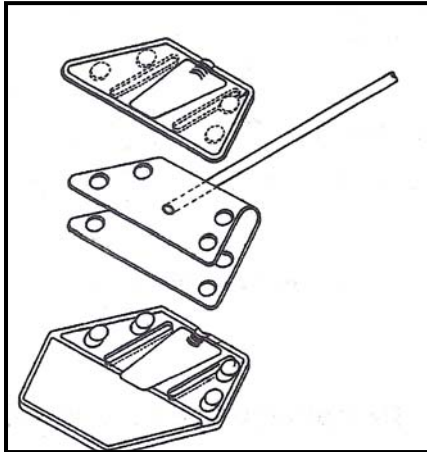


Figura 3. Estructura de la válvula de Ahmed, en la imagen se observa las distintas partes de las que esta formado el implante: la plataforma, las membranas de silicona y el tubo (Ahmed, 2008).

El prototipo AGV-S2 consiste en dos membranas de silicona comprimidas entre dos placas de polipropileno. La tensión entre las membranas esta diseñada para que solo se permita la salida de líquido cuando la PIO está entre 8 mmHg y 10 mmHg.

El tubo del implante tiene un diámetro externo de 0.6mm, un diámetro interno de 0.3 mm y la superficie de la plataforma es de 184 mm² con unas dimensiones de 13x 16 mm (Ahmed 2008).

La resistencia de la membrana se regula por la PIO, así cuando la PIO es alta en la cámara anterior las membranas permanecen separadas, pero cuando la PIO baja, la distancia entre las membranas disminuye y la válvula se cierra, como ilustra la figura 4 (Ahmed 2008). El sistema valvulado permite controlar la hipotonía que es el mayor factor de riesgo para el desarrollo de desprendimiento coroideo.

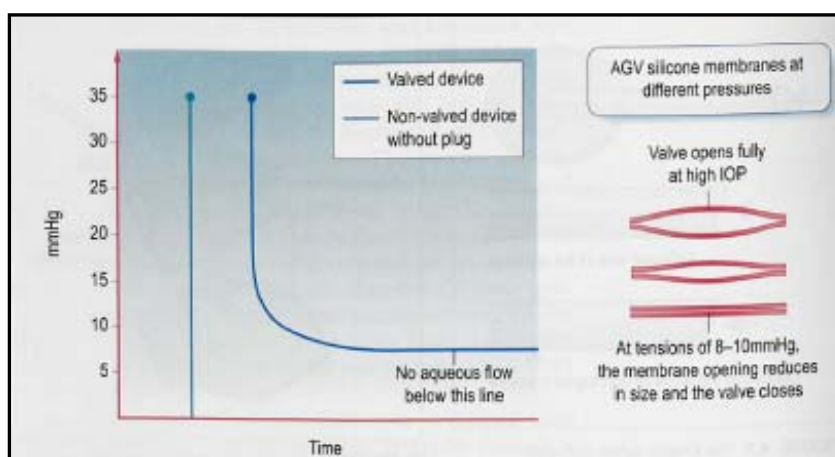


Figura 4. En la línea vertical izquierda se observa un sistema no valvulado y se describe como la presión (en mmHg) disminuye de forma aguda de forma inmediata. En la línea azul de la derecha el sistema es valvulado, la variación de la presión es progresiva respecto al tiempo y cuando la presión alcanza un nivel el sistema se cierra y ya no permite que siga disminuyendo (Ahmed 2008)

i) Dinámica de fluidos de la Válvula de Ahmed

La válvula de Ahmed funciona gracias a un efecto Venturi. El efecto Venturi se basa en la diferencia de velocidad de un fluido en un tramo de una tubería que tiene menor sección respecto a un tramo con mayor sección. En el tramo de menor sección la velocidad es mayor y por tanto la presión en esa sección es menor (Grubelnik 2005).

La válvula de Ahmed hace uso de una cámara trapezoidal para que gracias a la ecuación hidrodinámica de Bernouilli se favorezca el flujo acuoso por el aumento de velocidad del líquido desde una superficie menor a una superficie mayor, de esta forma se reduce la fricción interna (Figura 5).

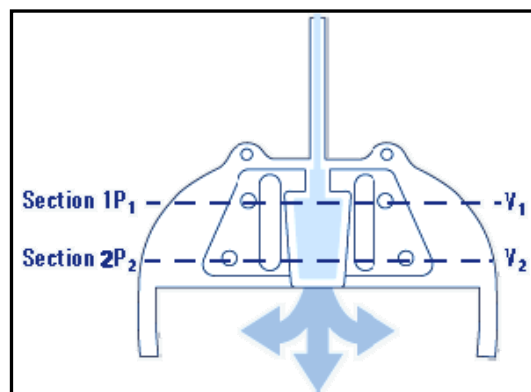


Figura 5. Esquema de la cámara trapezoidal con diferencia entre la sección 1P y 2P. $1P > 2P$ en consecuencia $V_2 > V_1$ lo que favorece el flujo de líquido a través de la sección (Ahmed 2008).

Complicaciones post- quirúrgicas

Actualmente la válvula de Ahmed es la más utilizada en oftalmología humana incluidos los casos de glaucoma neovascular, congénito y uveítico. En medicina humana las complicaciones del gonioimplante tipo Ahmed asociadas a glaucoma con factor inflamatorio son: desprendimiento coroideo (24.8%), hipema (16.5%), estrechamiento de la cámara anterior (15.8%), aposición endotelio /tubo (10.5%), vesícula encapsulada (6.1%), queratitis estriada (4.3%), cámara anterior plana (3.6%), catarata (3.2%), iritis (2.5%), bloqueo del tubo (2.1%), tubo expuesto (2.1%), descompensación corneal (1%), endoftalmitis (0.7%), diplopía (0.7%), desprendimiento de retina (0.7%) y glaucoma maligno (0.35%) (Gil et al., 1998).

En medicina veterinaria, las complicaciones descritas se han asociado a la oclusión del implante por fibrina en un periodo post-operatorio cercano, típicamente en las primeras semanas, y como complicaciones tardías la fibrosis de la vesícula de filtración (Gelatt, 2007). Los factores responsables de este fallo son aquellos que de alguna forma estimulan la proliferación fibrótica subconjuntival, entre los que se incluyen cirugía conjuntival previa, inflamación, afaquia, glaucomas neo-vasculares y el uso previo de mediación antiglaucomatosa (Ruderman 2005). Otros factores que favorecen la fibrosis son excesiva cauterización del tejido, sangrado post-quirúrgico y manipulación intraoperatoria. (Skuta et al., 1992)

Para evitar la fibrosis de la vesícula de filtración se ha combinado a esta técnica el uso de antimetabolitos como son la mitomicina C (MMC) y el 5-fluorouracilo (5-FU), aplicados en el lecho donde se alojará la válvula de forma

intraoperatoria (Skuta et al., 1992). El uso de 5-FU en inyecciones subconjuntivales en el periodo post quirúrgico se relaciona con un aumento del éxito de la cirugía filtrante en ojos de alto riesgo. Estas drogas, inhiben la proliferación de fibroblastos de la conjuntiva y episclera y se usan para prevenir la fibrosis episcleral (Francis, 2005). La mitomicina C inhibe también la síntesis proteínica y angiogénesis y el 5-fluoruracilo (5-FU) es un análogo de base pirimidínica y consigue el mismo efecto introduciéndose en segmentos de ADN replicados (Filippopoulos, 2009). Sin embargo, el uso de estas drogas en las cirugías filtrantes, se ha relacionado con una mayor incidencia de vesículas filtrantes finas, avasculares, quísticas que se asocian a complicaciones infecciosas y de fugas tardías debido a un mecanismo de isquemia y ruptura de la conjuntiva (Debry, 2002) (Francis, 2005). En medicina humana la incidencia de fugas a través de la vesícula se cifraba en un 3.3 %, pero tras la introducción de las drogas antimetabolitos esta complicación ha aumentado a un 10% (Skuta et al., 1992). Además las fugas tardías se han asociado a un mayor de riesgo de vesiculitis o endoftalmitis debido a la contaminación de la cámara anterior a través de la película lagrimal (Soltau, 2000).

En cuanto a la PIO, en el período post-operatorio, en medicina humana se han descrito tres fases en las que pueden existir fluctuaciones en la misma (Figura 6). Estas son fases aguda, subaguda y tardía.

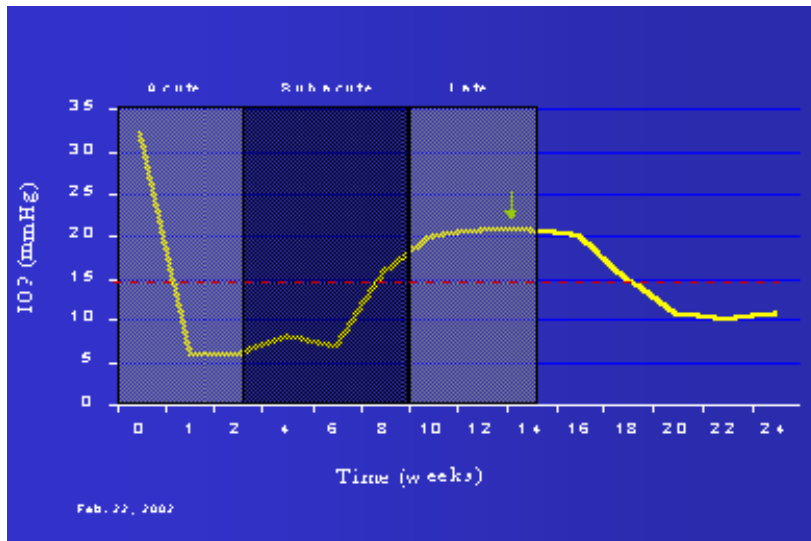


Figura 6. En la gráfica se observan tres etapas, a la izquierda en el período entre 0-2 semanas se detecta una disminución de la presión intraocular aguda y rápida. La segunda etapa entre 2.5-9 semanas respresenta un aumento de la PIO de forma progresiva debido a la cicatrización del tejido. La tercera fase comienza cuando la vesícula filtrante se vasculariza de forma que el drenaje del humor acuoso se comienza a realizar a través del lecho vascular, lo que permite un control progresivo y lento de la PIO (Hill,2000).

FASE AGUDA, HIPOTENSIVA; Comienza inmediatamente después de la cirugía y se mantiene por lo menos durante 2 a 4 semanas. Durante este período la PIO se mantiene baja debido a que el humor acuoso fluye libremente al espacio subconjuntival.

FASE SUBAGUDA, HIPERTENSIVA; Esta fase tiene una duración de 2 a 9 semanas. Fue descrita inicialmente por Ayyala et al. en 1998. El estudio histológico en personas describe la formación de una pseudocápsula fibrosa alrededor del implante. La cápsula restringe el drenaje de humor acuoso induciendo un incremento en la PIO.

FASE TARDIA, NORMOTENSIVA. Esta fase tiene una duración de 4 a 6 semanas comienza cuando la vesícula se vasculariza y permite al humor acuoso

ser drenado por el lecho vascular. Conforme esta vascularización evoluciona, la PIO disminuye progresivamente (Hill, 2000).

3. *Vesícula filtrante*

La válvula de Ahmed controla la PIO creando una fistula entre la cámara anterior y el espacio subconjuntival en donde se forma por efecto de la acumulación del humor acuoso una vesícula filtrante (Figura 7).

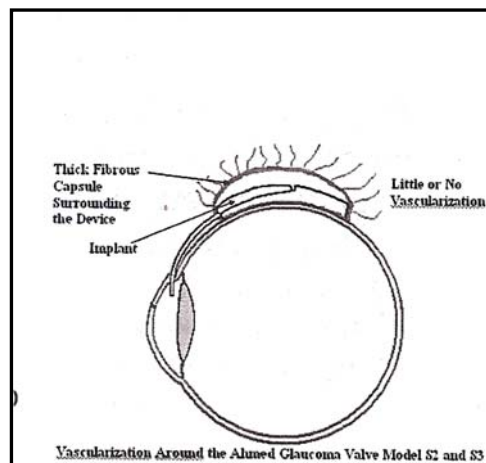


Figura 7. Esquema de la estructura de una vesícula filtrante, localizada entre la conjuntiva y el gonioimplante (bjo.bmj.com).

El término vesícula filtrante se refiere a una elevación de la conjuntiva asociada a la cirugía filtrante e incluye a las estructuras: tejido conjuntival y cápsula de Tenon. Posteriormente el humor acuoso atraviesa la vesícula y se absorbe bien por las venas y vasos linfáticos de la conjuntiva o bien fluye hacia la película lagrimal en caso de vesículas filtrantes muy finas (Filippopoulos, 2009).

Clínicamente las vesículas de filtración son descritas atendiendo a su elevación, vascularización, extensión y la presencia o no de microquistes. Las características de la ampolla o vesícula de filtración ideal son: aspecto difuso, ligeramente elevada y relativamente avascular. Una de las ventajas de las vesículas difusas es que reducen la presión localizada sobre la pared de la ampolla disminuyendo el riesgo de un adelgazamiento progresivo a ese nivel. En el caso de una vesícula filtrante encapsulada, podemos observar una vesícula elevada en forma de colina muy demarcada y tensa. En medicina humana la formación de vesícula filtrante encapsulada se ha descrito en el 15% de los casos tras trabeculectomía y en 20% de los casos asociados a la implantación de la válvula de Ahmed (Schwartz, 1999) (Eibschitz, 2005).

Así, el tamaño y el grosor de la vesícula de filtración, juegan un factor primordial en el éxito del mantenimiento adecuado de la PIO. (Philipp, 1990) y por lo tanto el interés de valorar su morfología en el período post-operatorio. Sin embargo, la vesícula no es fácilmente observable con lámpara de hendidura, por lo que actualmente se ha descrito para su evaluación, el ultrasonido en modo B con sonda de 10 MHz y la ultrabiomicroscopía (BMU)(Lloyd, 1993)(Aubin, 2003).

La biomicroscopía ultrasónica (BMU) es un instrumento efectivo para la visualización de las estructuras en la cámara anterior de pacientes humanos y animales. Es una forma especializada de ultrasonido que produce una imagen detallada y magnificada de las estructuras superficiales del ojo. Las sondas utilizadas van desde 50 MHz a 100 MHz, siendo la de 50 MHz la más utilizada. Esta sonda permite una profundidad de visión de 4-5 mm con una resolución de 50 μm . En medicina veterinaria se ha aplicado su uso en el estudio del ángulo

iridocorneal en el glaucoma (Crumley, 2009). En medicina humana la BMU se ha utilizado para visualizar los cambios producidos en la cámara anterior, en el ángulo y en la vía de drenaje tras la cirugía filtrante, lo que ha permitido comparar el efecto producido por las diferentes técnicas utilizadas y valorar su funcionalidad (Martínez-Bello,1999).

Histología

i) histología de la conjuntiva bulbar normal

La conjuntiva bulbar normal está formada por una capa de epitelio estratificado escamoso sobre una fina membrana basal y el estroma formado por tejido conectivo no organizado. Normalmente hay 4 capas de células epiteliales en el epitelio de la conjuntiva bulbar aumentando hasta 10 y 15 capas en la región pericorneal. (Francis, 2005)

Las células epiteliales de las capas media cuando van madurando, van progresando a las capas más superficiales al mismo tiempo que se aplanan aunque no se suelen queratinizar. Por otro lado, las células caliciformes se diferencian de la capa basal epitelial y típicamente se encuentran localizadas en la capa media del epitelio conjuntival. Por último en el estroma se localizan linfocitos en la porción más superficial, mientras que en la capa fibrosa más profunda se encuentran fibras de colágeno, fibras elásticas, canales linfáticos y vasos sanguíneos (Filippopoulos, 2009).

ii) histología de la vesícula filtrante

Histológicamente en la vesícula filtrante funcional se han descrito dos zonas:

1. Una zona externa, fibroproliferativa caracterizada por la síntesis de colágeno, numerosos fibroblastos, macrófagos tisulares y capilares sanguíneos. Se produce en respuesta a la inflamación y cicatrización post-quirúrgica.

2. Una zona interna, fibrodegenerativa caracterizada por células experimentando apoptosis rodeadas por una red de colágeno degenerado. Cuando el humor acuoso se acumula bajo la pared de la vesícula, se va generando una resistencia al flujo del humor acuoso de la cámara anterior del ojo a la vesícula filtrante lo que conlleva a un aumento de la presión intravesicular. Cuando esta presión aumenta se produce una disminución en el flujo vascular capilar lo que tiene como consecuencia una hipoxia localizada y consecuentemente apoptosis de fibroblastos y degeneración de la malla de colágeno (Molteno, 2006)(McCluskey, 2009).

A partir de estudios en medicina humana, se han podido determinar las características histológicas y clasificar las vesículas en funcionales, encapsuladas y con dehiscencias o fugas (Filippopoulos, 2009). En las vesículas funcionales se describe un epitelio conjuntival normal aunque más fino o atenuado y un aspecto mixoide de la malla de colágeno con unas fibras cortas y sin patrón de orientación definido (Addick, 1983). Las vesículas encapsuladas no funcionales presentan una reacción vascular e infiltración de fibroblastos y células inflamatorias en el estroma

conjuntival, en este caso la malla de colágeno es muy densa y las fibras se disponen de forma uniforme y paralela. En las vesículas no funcionales por dehiscencia de tejido se observa la presencia de pérdida de epitelio conjuntival con degeneración basofílica de la malla de colágeno (Francis, 2005). Recientemente se ha descrito una respuesta exagerada cicatricial en vesículas filtrantes con fugas que habían sido tratados con mitomicina C. En este trabajo, los autores describen en el 90% de los casos relieves del estroma recubiertas por un epitelio atenuado y en el 75% de los casos crecimiento fibrovascular desde el margen de la vesícula interdigitando con las zonas acelulares descritas anteriormente(Francis, 2005).

4. Metaloproteinasas

Las metaloproteinasas de matriz (MMP) son una familia de enzimas proteolíticas que tienen como función mantener y remodelar la arquitectura tisular. Tienen como sustrato una gran variedad de componentes de la matriz extracelular, citoquinas secretadas y moléculas de superficie celular y se han implicado recientemente en un amplio marco de situaciones fisiológicas y patológicas (Sivak, 2002).

Las MMP son endopeptidasas secretadas en forma de pro-enzimas y activadas en el ambiente extracelular. Existen más de 20 tipos de MMP en vertebrados (Sivak, 2002). Las células encargadas de sintetizarlas son los macrófagos, fibroblastos, neutrófilos, células epiteliales y células endoteliales. Además en la córnea y bajo condiciones de enfermedad se ha detectado su

expresión en células inflamatorias, células epiteliales y queratocitos (Boveland, 2010).

Las diferencias estructurales entre las MMP les confieren la especificidad del sustrato, regula la unión a la proteína de la matriz extracelular y determina la interacción con los inhibidores tisulares de las metaloproteinasas (ITMP), como característica general de los componentes de la familia requieren la presencia de zinc en su sitio activo.

La familia de metaloproteinasas está dividida en 4 categorías;

a) colagenasas, son las encargadas de reconocer el colágeno tipo I, II y III; b) gelatinasas encargadas de degradar el colágeno desnaturalizado y los componentes de la membrana basal y degradan específicamente la membrana basal del colágeno tipo VII y están involucradas en la migración de pigmento en varios tejidos (Kawhasima 1998); c) estromelinas, reconocen una variedad de colágeno y proteoglicanos y activa otras MMP; y d) las MMP tipo de membrana (MMP-TM) las cuales están unidas a la superficie celular y están implicadas en actividades pericelulares (Nagase, 1999).

Las metaloproteinasas están contrarreguladas por los inhibidores tisulares de las metaloproteinasas (ITMP). Se trata de proteínas secretadas y se pueden encontrar en la superficie celular en asociación, por ejemplo, de proteínas de membrana. Se han descrito 4 tipos de ITMP en mamíferos (ITMP-1, 2, 3 y 4). Además de regular la función de MMP son imprescindibles en el control de distintos procesos fisiológicos y patológicos, como son la invasión celular de tumores, angiogénesis, degradación del cartílago articular, implantación del

trofoblasto, involución de la glándula mamaria y la cicatrización de heridas (Mandal, 2003) (Barek, 2002).

Proceso cicatricial y mediadores moleculares

Como respuesta a un daño tisular se produce una respuesta inflamatoria caracterizada por el flujo de neutrófilos y monocitos, seguidos por linfocitos y macrófagos. Posteriormente se liberan por estas células, mediadores inflamatorios y factores de crecimiento lo que da lugar a la angiogénesis y migración de fibroblastos. A continuación se produce síntesis de la matriz extracelular, contracción de la herida mediada por los fibroblastos y por último la remodelación de los tejidos (Esson, 2004).

Los mediadores específicos de la cicatrización y remodelación de la vesícula filtrante son el factor de crecimiento transformante (TGF- β 2) y el factor de crecimiento tisular conectivo (CTGF). (Sherwood, 2006). En un modelo experimental de cirugía filtrante en rata se ha podido demostrar una sobreexpresión de TGF- β 2 y CTGF en el día 5 post-cirugía, mientras que en el período más tardío se encontró una sobreexpresión de las metaloproteinasas MMP-2, MMP-2 y MMP-9 (Esson, 2004). En esta fase final de la cicatrización es cuando se produce la degradación y reorganización de las fibras de colágeno y otras proteínas de la matriz extracelular así como la contracción cicatricial regulado por las MMP (Sherwood, 2006).

Metaloproteinasas- gelatinasas

Las gelatinasas (MMP-2 y 9) son enzimas encargadas de metabolizar el colágeno desnaturalizado, así como la elastina y vitronectina. En la figura 8 se ilustra la estructura química de las gelatinasas.

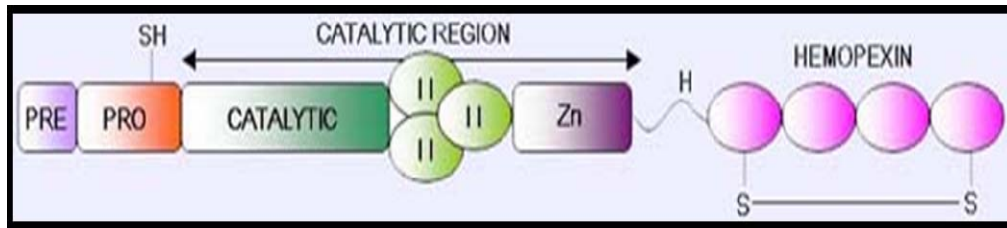


Figura 8. Estructura química de las gelatinasas (Sivak 2002)

La expresión de MMP y ITMP está regulada fisiológicamente y típicamente se encuentran en nivel comparables, manteniendo así un balance entre ellos (Seo, 2008). Niveles aumentados de MMP y ITMP se han observado en enfermedades inflamatorias, cáncer, fibróticas y neurológicas degenerativas (Boveland 2010). Respecto al ojo, alteraciones en el equilibrio MMP/ITMP se han descrito en la catarata secundaria, pterigion y la vitreorretinopatía proliferativa. Además en el glaucoma la acumulación de la matriz extracelular es uno de los mecanismos de resistencia al drenaje del humor acuoso, y por último la regulación de la matriz extracelular es imprescindible para el éxito de la cirugía filtrante (Sherwood, 2006).

Así los ITMP se han postulado como una arma terapéutica para control de la fibrosis post-quirúrgica. El fármaco ilomastat un ITMP de amplio espectro, se ha probado en el modelo experimental en el conejo y demostró un mayor tiempo de

supervivencia de la vesícula filtrante respecto al grupo placebo (Wong et al., 2005). Hay estudios que sugieren que los ITMP pueden estar involucrados en la proliferación celular in vivo y que posee una actividad promotora del crecimiento celular en células en vitro bovino y humano. Además en la células corneales en cultivo en el conejo aumenta la síntesis de DNA (Kawashima 1998).

Por lo anterior, la evaluación de la expresión de MMP y ITMP en las vesículas filtrantes encapsuladas contribuiría a un mayor entendimiento del proceso de cicatrización y posibles estrategias terapéuticas. Por otro lado, en vesículas filtrantes con dehiscencia se ha descrito una mayor expresión de MMP-9 y también se ha planteado el uso de sus inhibidores como posible estrategia terapéutica (Chintala, 2005).

IV. Justificación

Se propone describir y clasificar los distintos tipos de vesículas filtrantes existentes en el perro con el fin desarrollar una estrategia eficaz en el aumento de supervivencia de la vesícula filtrante asociada a válvula de Ahmed en el perro. El conocimiento y caracterización de las distintas formas de vesícula filtrante no funcional permitiría en el perro un manejo más efectivo del gonioimplante. Las MMP juegan un papel esencial en la degradación de la matriz extracelular en el proceso cicatricial tras la cirugía filtrante y pueden representar un objetivo terapéutico para evitar fibrosis y entender la dehiscencia de la vesícula en el periodo post-operatorio.

En la literatura veterinaria revisada, no se han descrito en el perro las distintas morfologías de las vesículas filtrantes desde el punto de vista histológico y del patrón de distribución de las metaloproteinasas y sus inhibidores tisulares.

V. Hipótesis

Existen hallazgos histopatológicos característicos de los distintos tipos de vesículas filtrantes en el perro, lo que permite realizar una clasificación de las mismas.

Hay diferencias en la inmunorreactividad de las metaloproteinasas MMP-2 y MMP-9 y de sus inhibidores tisulares ITMP-1 y ITMP-2 en la conjuntiva y cápsula de Tenon de vesículas filtrantes funcionales, vesículas con dehiscencia, encapsuladas y en perros sanos.

VI. Objetivos

Objetivo 1. Describir los hallazgos morfológicos clínicos e histopatológicos en vesículas filtrantes (funcional, encapsulada y con dehiscencia).

Objetivo 2. Estudiar la diferencia de expresión de las metaloproteinasas MMP-2 y MMP-9 y de sus inhibidores tisulares ITMP-1 y ITMP-2 en la conjuntiva y cápsula de Tenon de perros implantados con la válvula de Ahmed AGV-S2 con vesícula filtrante funcional, con dehiscencia o encapsuladas y de perros sanos.

VII. Material y Métodos

Los animales estudiados (n=17) fueron perros con presentación espontánea de glaucoma agudo unilateral, recibidos por el problema ocular en el Hospital Veterinario de Especialidades de Mexico DF, entre Junio 2008 y Junio 2010. Se realizó un examen general completo consistente en valoración de tiempo de relleno capilar, temperatura, palpación abdominal y auscultación pulmonar y cardíaca y solo se incluyó en el estudio los animales libres de signos de cualquier enfermedad sistémica. A todos ellos se les realizó bajo condiciones de consulta y sin inmovilización estresante un examen ocular completo consistente en exploración neuro-oftalmológica, Test de Schirmer, tinción con fluoresceína, gonioscopía, examen con lámpara de hendidura (Kowa SL-14, Kowa, Tokyo, Japan), oftalmoscopía indirecta (Heine Omega 200, Heine Instruments Canada, Ontario, Canada), y tonometría de aplanación (Tonopen-XL, Mentor, Norwell, MA, USA). La medición de la presión intraocular se realizó en el animal consciente con anestésico tópico (tetracaina clorhidrato 0.5 %, Ponti Ofteno, Laboratorio Sophia, México).

Los criterios de inclusión en este estudio fueron la presencia de signos clínicos compatibles con evolución de glaucoma con disminución de la agudeza visual, midriasis, excavación de la cabeza del nervio óptico y congestión de los vasos episclerales aunque la transparencia de los medios intraoculares fue mantenida en todos los casos.

Los animales fueron pacientes de glaucoma sin un buen control de la PIO, por lo que se realizó la implantación de gonioimplante, válvula de tipo Ahmed (AGV-S2) como terapia para el paciente.

Colocación quirúrgica del implante: tras realizar una disección del tejido conjuntival, la plataforma es implantada entre la cápsula de Tenon y la esclera a una distancia de 8-10mm del limbo donde los tejidos toleran mejor la formación de la vesícula filtrante (Figura 9). El manejo quirúrgico de la conjuntiva es primordial para el éxito de la cirugía, en todo momento debe de estar húmeda y ser manipulada delicadamente (Jones et al., 2008).

El implante es colocado en el cuadrante dorso-temporal entre la inserción del músculo recto lateral y dorsal evitando el daño del tendón del músculo oblicuo dorsal. Posteriormente el tubo del gonioimplante es insertado en la cámara anterior tras la realización de una tunelización y paracentesis. (Figura 10).

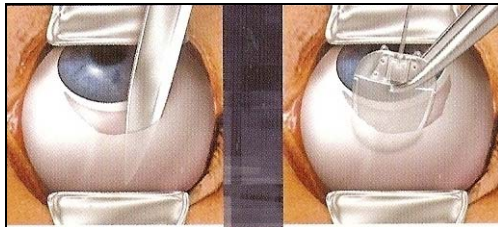


Figura 9

Figura 9. Ilustración que muestra la disección del espacio subconjuntival e implantación de la plataforma (Ahmed 2008).

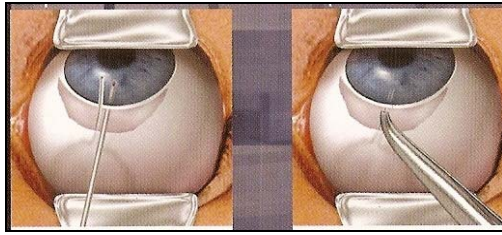


Figura 10

Figura 10. Ilustración que muestra la tunelización y posterior implantación en cámara anterior del tubo del gonioimplanta (Ahmed 2008).

DISEÑO EXPERIMENTAL

Los animales fueron sometidos a anestesia general con el siguiente protocolo: Premedicación anestésica con maleato de acepromacina (0.05 mg/kg) y butorfanol 0.1 mg/kg. A continuación los pacientes fueron inducido con propofol 5mg/kg administrado por vía intravenosa y posteriormente se realizó mantenimiento anestésico inhalatorio con Isoflurano.

Se formaron 4 grupos.

Grupo I (n=10), animales que sufrían complicaciones hipertensivas y con presencia de una vesícula filtrante indicando fase de vesícula encapsulada.

Grupo II (n=2), estudio con animales con vesícula filtrante funcional.

Grupo III (n=5), animales con complicaciones en la vesícula filtrante sean sépticas, visualización de la válvula o protusión de la misma.

Grupo IV (n=5) control, animales sanos que no sufren ninguna enfermedad ocular.

En los grupos I, III y IV la conjuntiva y cápsula de Tenon se obtuvo durante el procedimiento quirúrgico. La biopsia se realizó en el área de 7 a 8 mm posterior al limbo y tuvo unas dimensiones de 2x2 mm, el material utilizado fue pinzas de fijación tipo Castroviejo y tijeras de tenotomía de Stevens..

En el grupo II, la enucleación se practicó cuando el paciente falleció por otra causa no relacionada con un mal funcionamiento de la vesícula. No se practicaron biopsias de vesículas filtrantes funcionales por el alto riesgo de complicaciones de fallo de la vesícula posteriormente. La biopsia del grupo IV se realizó tras la muerte del paciente por otras causas no relacionadas con ninguna enfermedad ocular.

El protocolo fue aceptado previamente por el Subcomité Institucional para el Cuidado de Animales en Experimentación (SICUAE) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

Evaluación clínica de la vesícula filtrante.

Se realizó una evaluación de la vesícula filtrante con los parámetros clínicos descritos a continuación:

1. El tamaño de la vesícula filtrante, fue valorado de forma semicuantitativa con la exploración con la lámpara de hendidura. Cuando no fue posible realizarla se evaluó a través del ultrasonido 10 MHz. La escala en la que se clasificó fue cámara anterior plana= 0, elevada=1 o alta y amplia=2.

2. Vascularización de la vesícula. La escala en la que se clasificó fue: 0=avascular, 1=normal o 2= hiperémica.

3. Inflamación en cámara anterior. La escala de clasificación fue: sin inflamación=0, células presentes=1, formación de fibrina=2 e hipopion presente=3.

4. Profundidad de la cámara anterior. La escala fue: plana=0, estrecha=1, profunda=2.

Se realizó una prueba de Ji cuadrada de Pearson para estudiar los parámetros 1 y 4.

Se realizó una prueba de Kruskal-Wallis para estudiar los parámetros clínicos 2 y 3. Y se realizó un análisis de regresión lineal para explicar el comportamiento de la presión intraocular en función de la edad del perro y grupo al que pertenece. Para el estudio estadístico se usó el programa SPSS v 16. software (SPSS Inc, Chicago Il).

Estudio histopatológico

El estudio histológico se realizó tras la fijación del espécimen quirúrgico en formaldehído al 10% y posterior inclusión en bloque de parafina. Se realizaron cortes histológicos de 4 micras y se tiñeron con hematoxilina-eosina y tricrómico de Masson. La evaluación histopatológica se realizó con microscopía de luz en el Servicio de Patología Oftálmica de la Asociación Para Evitar la Ceguera en México por un patólogo que desconoció en todo momento la identificación de la pieza estudiada. En cada pieza histológica se valoraron de forma cuantitativa los siguientes parámetros en 10 campos de gran aumento:

1. Áreas de quistes subconjuntivales. La escala fue: ausencia=0, escasos=1, fácilmente visibles=2, extensa, en la mayoría de los campos=3, en cada campo=4)
2. Metaplasia escamosa (0= no, 1=solo identificable, 2=obvia, 3= en cada campo).
3. Vascularización subconjuntival. Se realizó el conteo de los neovasos que se observaron en 10 campos de gran aumento. Se definió como neovaso aquél que posee pequeño calibre y que se encontraba en la zona de transición entre la capa fibrótica y fibroproliferativa.

4. Fibras de colágeno. La escala de clasificación fue: sin patrón de disposición=1, fibras densas y uniformemente orientadas=2 y degeneración focal del colágeno=3.

Se realizó una prueba de Ji cuadrada de Pearson de homogeneidad de proporciones entre los grupos para estudiar el parámetro 1, 2 y 4. Por otra parte, se realizó un análisis correspondiente a un diseño de un solo factor (grupos de ojos) con 4 niveles para el estudio del número de vasos, parámetro 3. Para el estudio estadístico se usó el programa SPSS v 16. software (SPSS Inc, Chicago II).

Estudio inmunohistoquímico

Las biopsias realizadas se obtuvieron y fueron procesadas de la siguiente manera. Se realizaron cortes de 4 µm de espesor con un microtomo y fueron desparafinados en xilol, posteriormente tratados con alcohol de concentraciones decrecientes e hidratados en agua bidestilada y equilibrado con PBS. A continuación la actividad de la peroxidasa endógena fue bloqueada por la inmersión de 30 minutos en Blocking Reagent, Biocare Medical PX96MM. Posteriormente las secciones fueron lavadas con PBS durante 5 minutos por tres ciclos y tras la inmersión en Triton 1% y posterior lavado se incubaron las secciones con Albumina como bloqueador durante 1 hora. A continuación se incubaron las secciones durante toda una noche a una temperatura de 4°C con los anticuerpos primarios de cada anticuerpo a una dilución de 1/200. Los anticuerpos utilizados fueron anti-cabra y están especificados en el Cuadro 1.

Anticuerpo	Proteína
C-19:sc-6838*	MMP-2
C-20:sc-6840*	MMP-9
C-20:sc-6832*	ITMP-1
C-20:sc-6835*	ITMP-2

Cuadro 1; anticuerpos anticabra utilizados en el estudio

* Santa Cruz Biotechnology, INC. Santa Cruz, CA,USA

Tras realizar tres lavados con PBS, los cortes se incubaron con el anticuerpo secundario biotinilado (burro anti-cabra); Chemicon Ap 180 b con una dilución 1/250 durante una hora a temperatura ambiente. Tras un ciclo de tres lavados con PBS de 5 minutos, las secciones fueron incubadas con conjugado de Streptavidina por 30 minutos ABC elite Vectastam y se realizaron otro ciclo de tres lavados con PBS. Las secciones fueron entonces incubadas con diaminobenzidina en un sustrato de peróxido de hidrógeno al 0.02%. La reacción fue detenida con agua destilada cuando la reacción se puso en evidencia en un tiempo aproximado de 5 minutos. Una sección de cada caso se fue preparada con PBS en lugar del anticuerpo específico y sirvió como control negativo.

La inmunorreactividad se definió como positiva (presente) o negativa (ausente) y se hizo un gradiente semicuantitativo usando una versión modificada del método descrito por Shah et al. y citado por Seo et al.

Grado 0 igual que el control

Grado 1 1%-25% del control

Grado 2 26-50% del control

Grado 3 51-75 % del control

Grado 4 >75% del control

Con los resultados obtenidos, se realizó la prueba de Kruskal-Wallis para comparar los grados de inmunorreacción de las metaloproteinasas MMP-2 y 9 y de sus inhibidores tisulares ITMP-1 y 2..

En virtud de que las variables MMP-2, MMP-9, ITMP-1 y ITMP-1 están medidas en escala ordinal se realizó la prueba de Mann Whitney (considerando empates), para evaluar si existían diferencias significativas entre los distintos grupos problema (vesículas encapsuladas, funcionales y con dehiscencia) y el grupo de animales sanos para cada una de las variables. SPSSv16.0 software (SPSS Inc, Chicago Il).

VIII. Resultados

a) Parámetros clínicos de glaucoma

En el presente estudio, se implantaron 37 válvulas tipo Ahmed. Finalmente, nuestra población incluida en el estudio fueron:

Grupo I: Vesículas encapsuladas, 10 ojos de 10 pacientes.

Grupo II: Vesículas con dehiscencia; 5 ojos de 5 pacientes.

Grupo III: Vesículas funcionales; 2 ojos de 2 pacientes.

Grupo IV: Conjuntiva normal y cápsula de Tenon de 5 pacientes.

Grupo I: Vesículas encapsuladas (n=10).

De los animales estudiados que presentaron complicación con formación de quiste de Tenon, 7/10 tenían glaucoma primario y 3/10 glaucoma secundario pseudofaco. Ocho de los animales fueron hembras y dos eran machos. La edad media en años fue de 9.38 años

La media de la presión intraocular en el momento del diagnóstico de la vesícula filtrante encapsulada fue 43.5 mmHg. La edad media de la vesícula filtrante en el momento de diagnosticarse el estado de quiste de Tenon fue de 32.9 semanas, en ese momento la media de número de medicaciones antiglaucomatosas que recibían los pacientes fue de 3.1.

En el cuadro 2 se resumen los datos clínicos y de reseña más relevantes de los paciente incluidos en el grupo I.

<u>Paciente/ Raza-sexo N=10</u>	<u>Tipo glaucoma</u>	<u>Edad (años)</u>	<u>PIO previo procedimiento (mmHg)</u>	<u>Edad vesícula (sem)</u>	<u>Nº medicación anti- glaucoma</u>
Weimaraner /H	Pseudofaco OS	2	61	2	3
Cocker Spaniel/H	Primario OD	4	37	32	3
Mestizo/H	Primario OD	0.8	30	3	3
Maltés/H	Primario OS	4	36	16	3
Mestizo/M	Primario OS	5	63	40	3
Cocker Spaniel/M	Primario OS	7	53	56	3
Mestizo/H	Pseudofaco OD	12	41	80	3
Shar-Pei /H	Primario OD	6	42	28	4
Cocker Spaniel/ H	Pseudofaco OD	8	30	32	3
Cocker Spaniel / H.	Primario OD	9	42	40	3

PIO: presión intraocular OD: ojo derecho/OS ojo izquierdo
H:hembra /M: macho

Grupo II: Vesícula filtrante funcional (n=2).

De los animales estudiados que con vesícula filtrante funcional, 1 sufría glaucoma primario y 1 glaucoma secundario pseudofaco. La edad media en años fue de 6.75 años y los dos pacientes fueron hembras.

La media de la presión intraocular en el momento del diagnóstico de la vesícula filtrante encapsulada fue 16 mmHg. La edad media de la vesícula filtrante en el momento del estudio histopatológico fue de 74 semanas, en ese momento la media de número de medicaciones antiglaucomatosas que recibían los pacientes fue de 2.

Cuadro 3 mostrando los datos clínicos más relevantes del grupo II.

<u>Paciente/ Raza-sexo N=2</u>	<u>Tipo glaucoma</u>	<u>Edad (años)</u>	<u>PIO previo procedimiento (mmHg)</u>	<u>Edad de vesícula filtrante (sem)</u>	<u>Nº medicación anti- glaucoma</u>
Poodle/H	Pseudofaco OS	11	12	104	2
Basset Hound/H	Primario OD	2.5	20	44	2

PIO: presión intraocular OD: ojo derecho/OS ojo izquierdo

H:hembra /M: macho

Grupo III; Vesícula filtrante con dehiscencia (n=5).

De los animales estudiados con vesícula filtrante con dehiscencia 3/5 sufrían glaucoma primario y 2/5 glaucoma secundario pseudofaco. La edad media en años fue de 7.5 años. 4 pacientes fueron hembras y 1 macho.

La media de la presión intraocular en el momento del diagnóstico de la vesícula filtrante con dehiscencia fue 8.4 mmHg. La edad media de la vesícula filtrante en el momento del estudio histopatológico fue de 34.6 semanas, en ese momento la media de número de medicaciones antiglaucomatosas que recibían los pacientes fue de 2.8.

Cuadro 4, refleja los datos clínicos más relevantes de los pacientes del grupo III

<u>Paciente/ Raza-sexo N=5</u>	<u>Tipo glaucoma</u>	<u>Edad (años)</u>	<u>PIO previo procedimient o (mmHg)</u>	<u>Edad de vesícula filtrante (sem)</u>	<u>N° medicación anti- glaucoma</u>
Poodle/H	Pseudofaco OS	8	12	10	3
Mestizo/M	Primario OD	5	6	6	3
Mestizo/H	Pseudofaco OD	12	7	103	2
Cocker Spaniel/H	Primario OS	6	7	2	3
Cocker Spaniel/H	Primario OD	6	10	52	3

PIO: presión intraocular OD: ojo derecho/OS ojo izquierdo

H:hembra /M: macho

RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN CLÍNICA DE LA VESÍCULA FILTRANTE

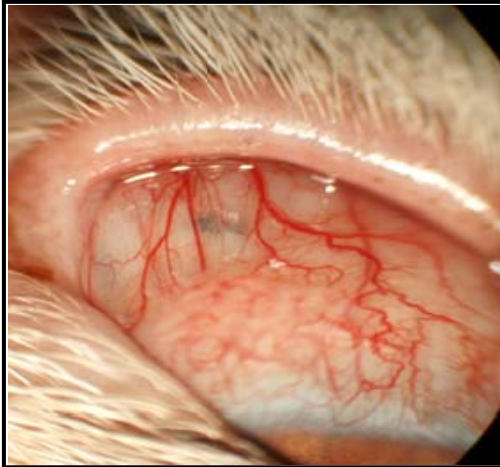
Los parámetros clínicos de evaluación de vesícula filitante se reflejan en la cuadro 5.

	<u>Apariencia</u>	<u>Vascularización</u>	<u>Inflamación</u>	<u>Profundidad</u>
	<u>Vesícula</u>	<u>Vesícula</u>	<u>C. A</u>	<u>C.A.</u>
Vesícula encapsulada (n=10)	8- Elevada 1- Alta amplia 1- Estrecha	4- Avascular 5- Normal 1- Hiperémica	7- Sin inflamación 1- Cel. presentes 2- Fibrina	7- Profunda 2- Estrecha 1- Plana
Grupo 2 (n=2)	2- Alta y amplia	2- Normal	2- Sin inflamación	1- Estrecha 1- Profunda
Grupo 3 Vesículas dehiscencia (n=5)	5- Dehiscencia, sin vesícula	3- Hiperémica 2- Normal	2- Células presentes 3- Fibrina	2- Plana 2- Estrecha 1- Profunda

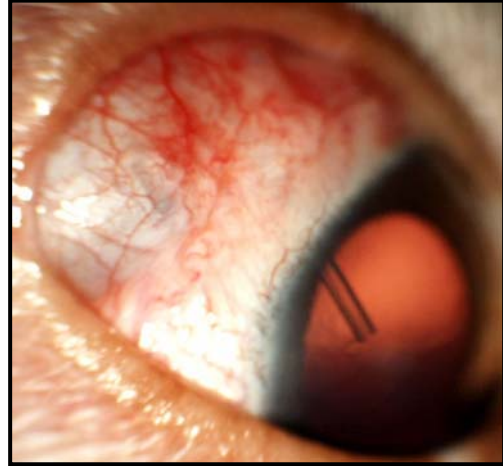
CA- cámara anterior

Grupo I; Vesículas encapsuladas. Imagen 11 A,B,C.

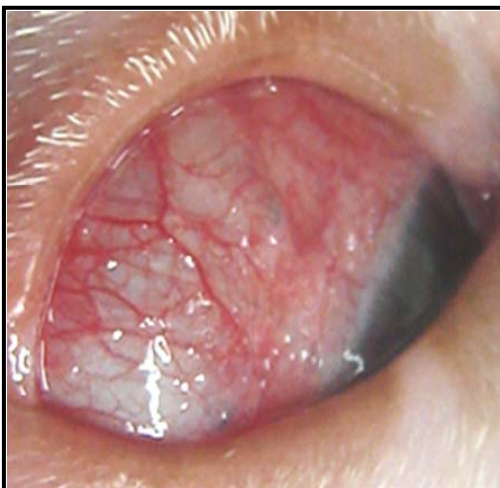
A



B



C



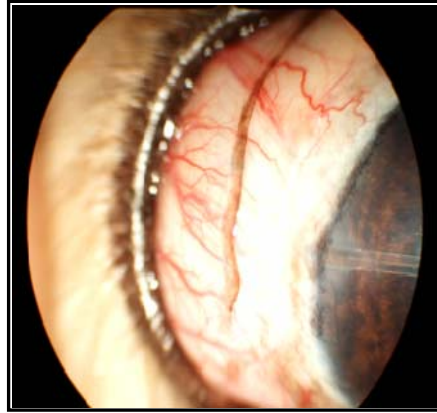
En la imagen 11 A,B,C se observan fotos clínicas de vesículas filtrantes encapsuladas con aspecto elevada, con tensión y relativamente avasculares. La PIO estaba en niveles por encima del margen normal.

Grupo II: Vesículas funcionales. Imagen 12 A, B, C, D, E.

A



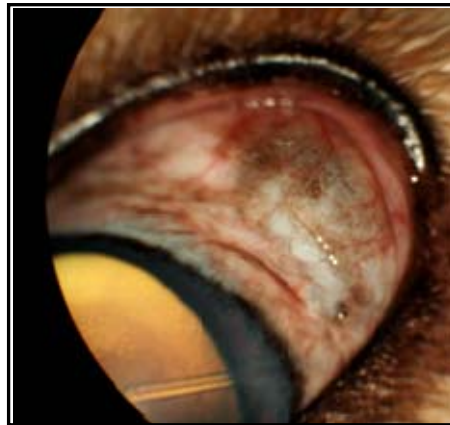
B



C



D



E

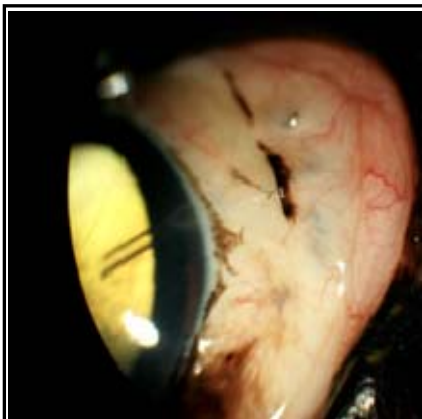
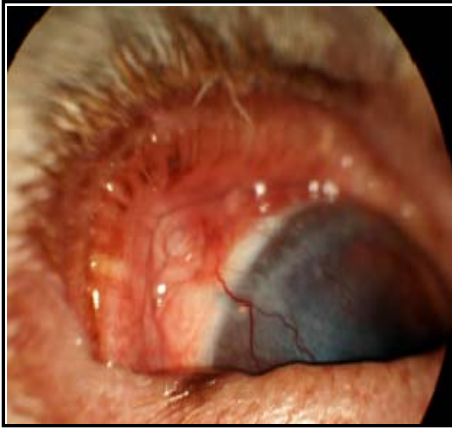


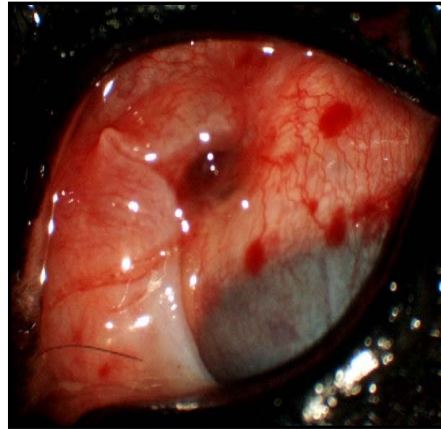
Imagen 12 A, B, C, D, E se observan vesículas filtrantes funcionales. Los niveles de PIO están dentro del margen de normalidad. El aspecto es moderadamente vascular y presentan un aspecto difuso y plana.

Grupo III; Vesículas con dehiscencia. Imagen 13 A,B,C,D

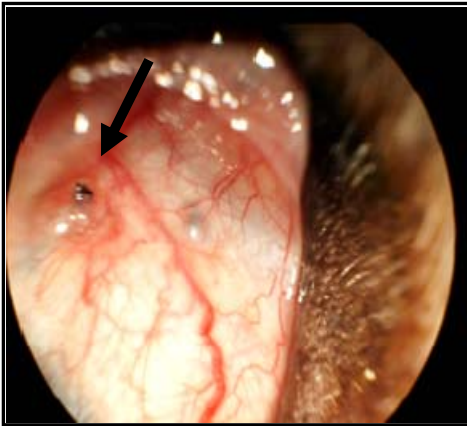
A



B



C



D

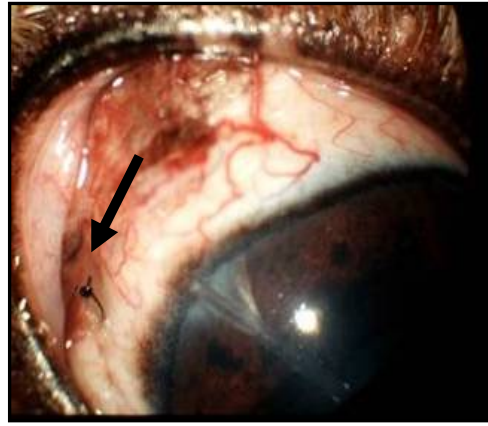


Imagen 13 A,B,C,D, se observan vesículas filtrantes con complicación séptica , vesícula plana no formada y con una gran hiperemia vascular. Las imágenes C y D son ejemplo de dehiscencia de la vesícula con la visualización de la sutura en la porción ventral (flecha) ,la reacción vascular es mínima.

Análisis estadístico: evaluación clínica de la vesícula filtrante.

a) Morfología de la vesícula filtrante.

Se comparó el grupo de vesículas encapsuladas contra un grupo formado por las vesículas funcionales y con dehiscencia en cuanto a morfología. Se realizó una prueba Ji cuadrada de Pearson de homogeneidad de proporciones entre los dos grupos y se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ellos ($p < 0.01$).

b) Vascularización de la vesícula filtrante.

Se comparó la vascularización en los tres grupos con vesícula y se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($p < 0.05$).

Para determinar a cuál o cuáles de los grupos de vesículas se debían las diferencias se realizó una prueba de comparaciones múltiples con un nivel de significancia global de .05. Para las comparaciones entre dos grupos se utilizó la prueba de Mann-Whitney. La única diferencia significativa ($p < 0.012$) fue entre el grupo de las vesículas encapsuladas y el grupo de las vesículas con dehiscencia.

c) Inflamación en cámara anterior.

Se comparó la inflamación en los tres grupos con vesícula y se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($p < 0.01$).

Para determinar a cuál o cuáles de los grupos de vesículas se debían las diferencias, se realizó una prueba de comparaciones múltiples con un nivel de significancia global de .05. Para las comparaciones entre dos grupos se utilizó la prueba de Mann-Whitney. La única diferencia significativa ($p < .01$) fue entre el grupo de las vesículas encapsuladas y el grupo de las vesículas con dehiscencia.

d) Profundidad de cámara anterior.

Se comparó el grupo de vesículas encapsuladas contra un grupo formado por las vesículas funcionales y con dehiscencia en cuanto a profundidad. Se realizó una prueba Ji cuadrada de Pearson de homogeneidad de proporciones entre los dos grupos y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ellos ($p > .05$).

e) PIO respecto grupo y edad.

Se realizó un análisis de regresión lineal para explicar el comportamiento de la presión intraocular en función de la edad del perro y grupo al que pertenece su ojo y ninguna de las dos variables resultó estadísticamente significativa.

RESULTADOS DEL ESTUDIO HISTOLÓGICO

Grupo I: Animales con vesícula encapsulada. (n=10).

En todos los casos se detectaron dos capas bien definidas, una externa fibroproliferativa y una interna fibrótica.

La zona fibroproliferativa; consistió en una malla de colágeno difusa con fibras cortas sin orientación definida, capilares y fibroblastos.

La zona fibrótica, Formada por una malla de colágeno con un patrón de distribución caracterizado por fibras paralelas orientadas en el mismo plano y densamente dispuestas (Figura 14).

La capa fibrótica ocupó en este grupo del 40 al 60% del espesor del tejido con un grosor medio de $330 \mu\text{m} \pm 57$.

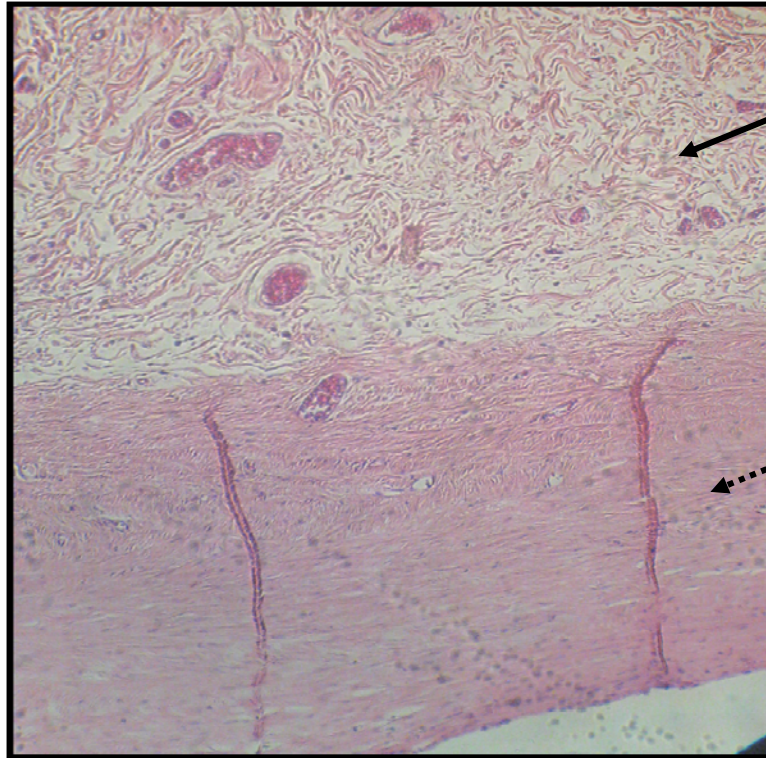


Figura 14. Fotomicrografía de un corte histológico de vesícula filtrante encapsulada. Microscopía de luz. Se observan las dos capas descritas. Flecha negra capa fibroproliferativa, se observa la presencia de malla de colágeno difusa comparada con la capa fibrótica, flecha punteada, donde la malla de colágeno es densa y uniformemente orientada. H-E, X100.

También se observaron neovasos localizados en la interfase entre la capa fibroproliferativa y fibrótica, en alguno de los casos estos presentaban congestión pero en ningún caso se observó trombosis asociada, tampoco se observó metaplasia escamosa o quistes subconjuntivales (Figura 15 A,B).

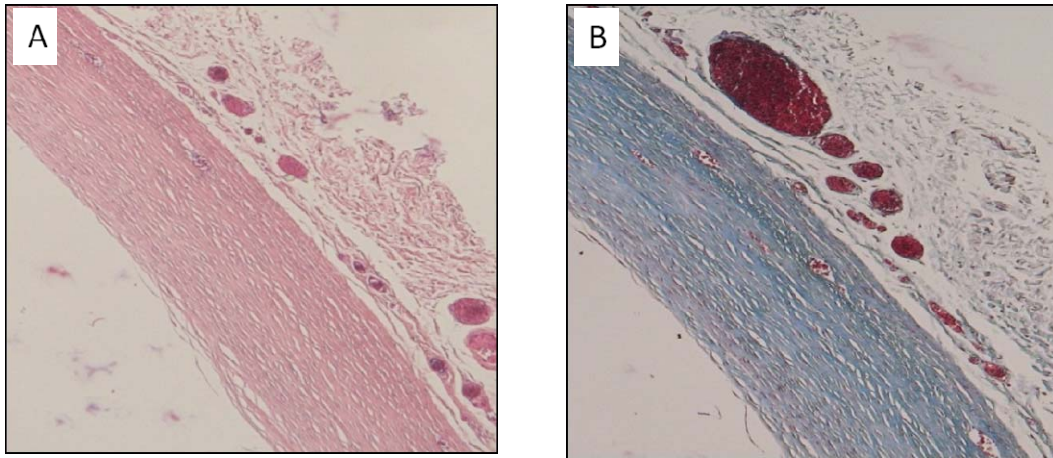


Figura 15 A, B Fotomicrografía de corte histológico de vesícula filtrante encapsulada. A) Se pueden observar la capa fibroproliferativa externa y la capa fibrótica interna, H-E, 40X. B) en la tinción con Tricrómico de Masson es posible observar la disposición de las fibras de colágeno y su disposición paralela recubriendo la cavidad de la vesícula. Los vasos sanguíneos se localizan en la interfase entre las dos zonas, en las imágenes se pueden observar como en este caso estaban dilatados y congestivos, Masson X40.

La célula más representada en la capa fibrótica es el fibroblasto, con una disposición característica. En la cara tisular de la cavidad quística, los fibroblastos presentaban núcleos aplanado, alargados formando un pseudoendotelio (Figura16).

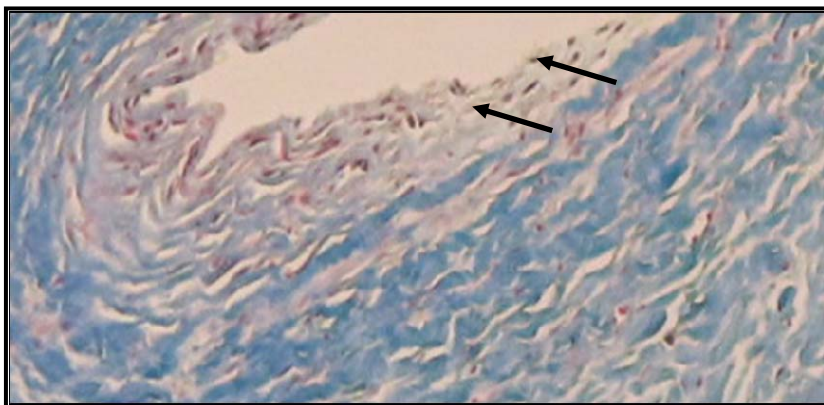


Figura 16. Fotomicrografía de un corte histológico de vesícula encapsulada. En esta imagen se observa como los fibroblastos presentan núcleos planos y alargados (flecha) hacia la cavidad quística formando un pseudoendotelio. Masson X100.

Grupo II. Animales con vesícula filtrante funcional (n=2).

En este grupo se observó epitelio conjuntival con morfología normal. El tejido subepitelial tenía una consistencia laxa con aspecto mixoide como se observa en la (Figura 17 y Figura 18). El colágeno se dispone en fibras cortas y sin patrón de distribución definido alrededor del gonioimplante.

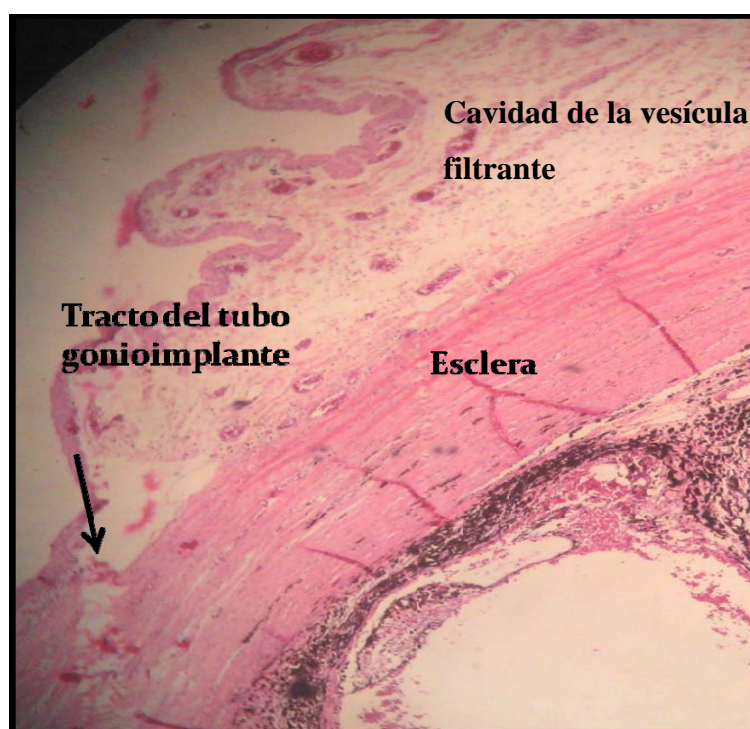


Figura 17. Fotomicrografía de corte histológico de vesícula filtrante funcional. Se observa el aspecto laxo mixoide del tejido subconjuntival rodeando la vesícula filtrante. En la imagen también se puede observar el tracto del tubo del gonioimplante H-E, X40.

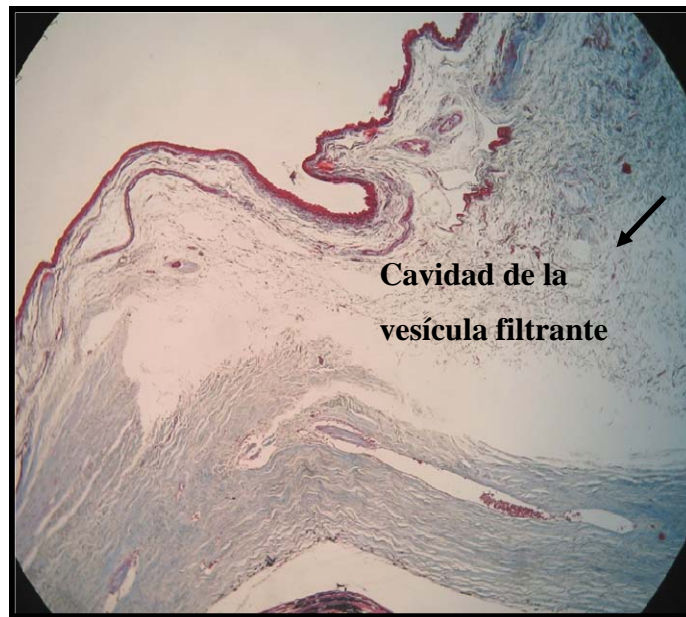


Figura 18. Fotomicrografía de corte histológico de vesícula filtrante funcional.. En esta imagen se puede observar la diferencia en la disposición del colágeno entre la esclera y el tejido subconjuntival laxo que rodea la cavidad filtrante (flecha). Tricrómico de Masson x40.

En ninguno de los casos se detectó metaplasia escamosa y en un caso de vesícula filtrante funcional se observó la formación de pseudoquistes subconjuntivales (Figura 19).

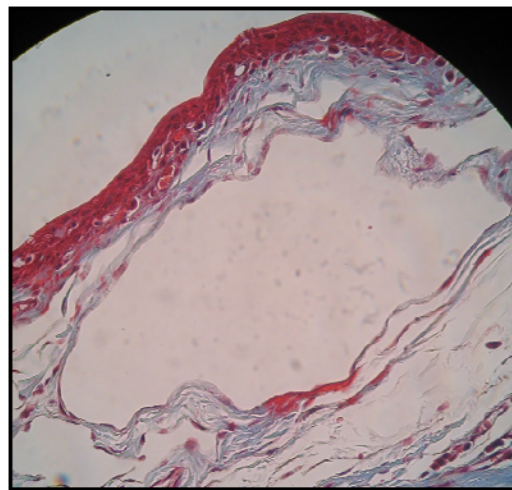


Figura 19. Fotomicrografía de corte histológico de vesícula filtrante funcional. Microscopía de luz. Pseudoquistes subconjuntivales. En el estroma conjuntival en la zona perivalvular se observan zonas claras donde se acumula el humor acuoso sin embargo, no se observó endotelio rodeando la estructura quística. Tricrómico de Masson X100.

Distribución celular y morfología: En el estroma conjuntival se observaron fibroblastos y células inflamatorias sobre todo localizadas en la zona perivalvular en la sustancia propia. Los vasos sanguíneos se localizaron de forma difusa en el estroma conjuntival.

Grupo III. Animales con complicación séptica, visualización de la válvula o protusión (n=5).

En estos casos se observó la presencia de epitelio escamoso estratificado y estroma conjuntival moderadamente laxo en la porción superficial. En la porción profunda se puede detectar la capa fibrosa caracterizada por la presencia de fibras de colágeno denso, así como vasos sanguíneos.

El patrón de la malla del colágeno en estos casos fue irregular con fibras cortas. Además en los todos los casos se observa un infiltrado inflamatorio en el estroma anterior así como vascularización intensa. (Imagen 20).

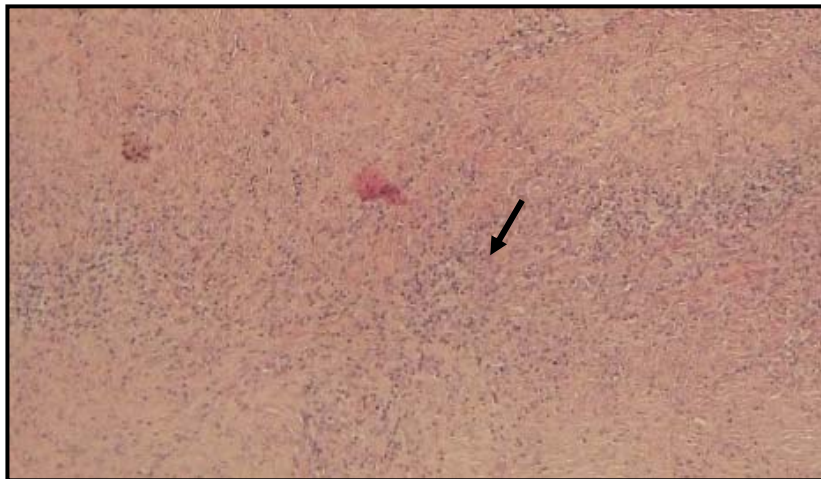


Imagen 20. Fotomicrografía de corte histológico de vesícula filtrante con dehiscencia. se observa la presencia de infiltrado inflamatorio en el estroma profundo, flecha, H-E X40.

Análisis estadístico de los datos

a) Metaplasia escamosa conjuntival y pseudoquistes subepiteliales

En ninguno de los casos estudiados se detectó la presencia de metaplasia escamosa, sólo un caso de vesícula funcional presentó pseudoquistes subepiteliales.

b) Vascularización subconjuntival

Se realizó el análisis correspondiente a un diseño de un solo factor (grupos de ojos) con 4 niveles, completamente aleatorizado. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el promedio de vasos entre los grupos ($p > 0.05$)

c) Análisis patrón de distribución fibras de colágeno

Se compararon el grupo de vesículas encapsuladas contra un grupo formado por el resto de grupos (del 2 al 4) en cuanto a fibras de colágeno. Se realizó una prueba Ji cuadrada de Pearson de homogeneidad de proporciones entre los dos grupos y se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ellos ($p < 0.000$).

RESULTADOS DE INMUNOHISTOQUÍMICA MMP-2, MMP-9, ITMP-1, ITMP-2

La inmunorreactividad se observó en el epitelio conjuntival, células endoteliales y fibroblastos, principalmente. Debido a que el objetivo de este estudio fue establecer el patrón de distribución de las MMP y ITMP en la capa fibrótica, solamente la inmunorreactividad de esa capa fue valorada y comparada a la inmunorreactividad de la conjuntiva del grupo control (sanos). En este último caso la zona a estudiar será la capa profunda fibrosa de la sustancia propia conjuntival.

Los controles omitiendo el anticuerpo primario no demostraron inmunorreactividad en ningún caso (Figura 21).

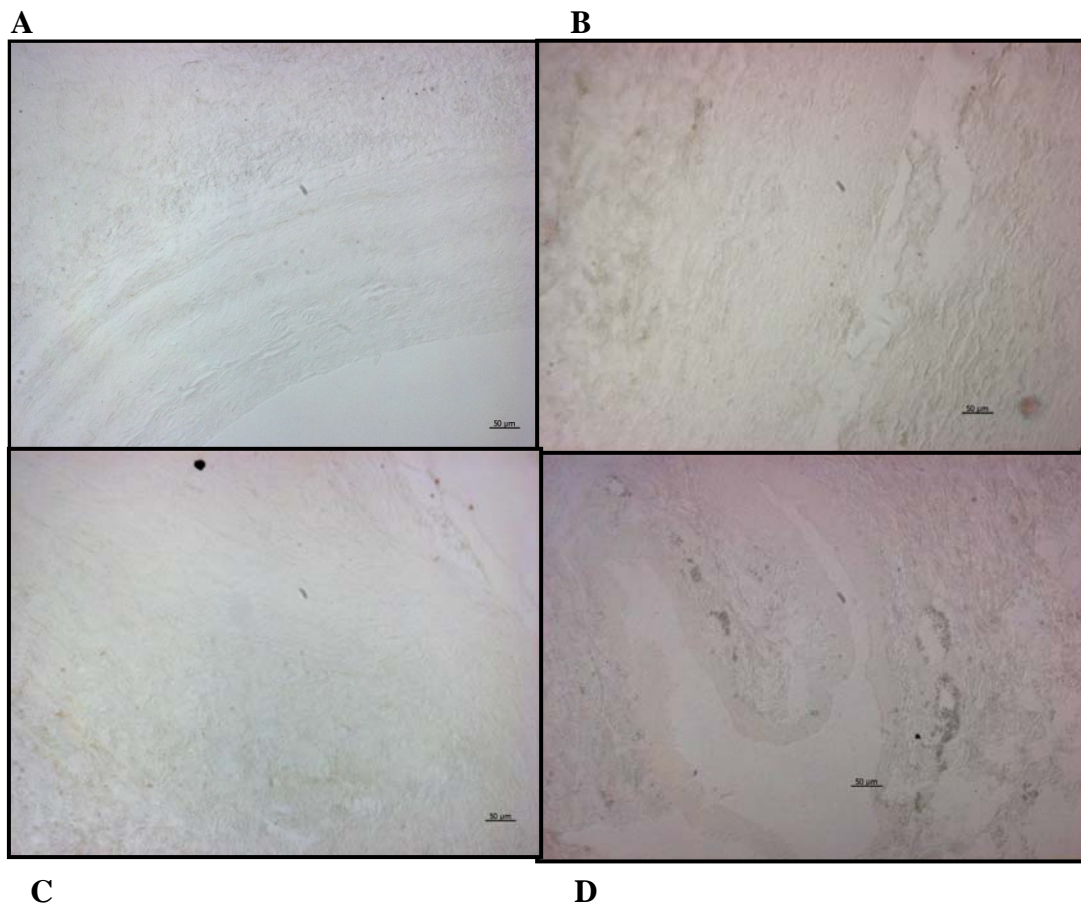


Figura 21. Inmunohistoquímica. Control negativo.. En este caso los especímenes no se incubaron con el anticuerpo primario, como se observa en la imagen no se detectó ninguna reacción. X20.

A, B- vesícula encapsulada

C- vesícula con dehiscencia

D- conjuntiva normal.

Grupo I: vesícula filtrante encapsulada (n=10).

En la capa fibrótica de las vesículas encapsuladas se observó una inmunorreacción moderada para MMP-2 con una intensa inmunoreactividad para MMP-9 en el citoplasma de las fibroblastos en todos los casos, (Figura 22 A,B). Por otro lado, la inmunorreactividad para ITMP-2 fue moderada en el citoplasma de los fibroblastos, mientras que no se encontró inmunoreactividad para la ITMP-1, (Figura 22 C, D).

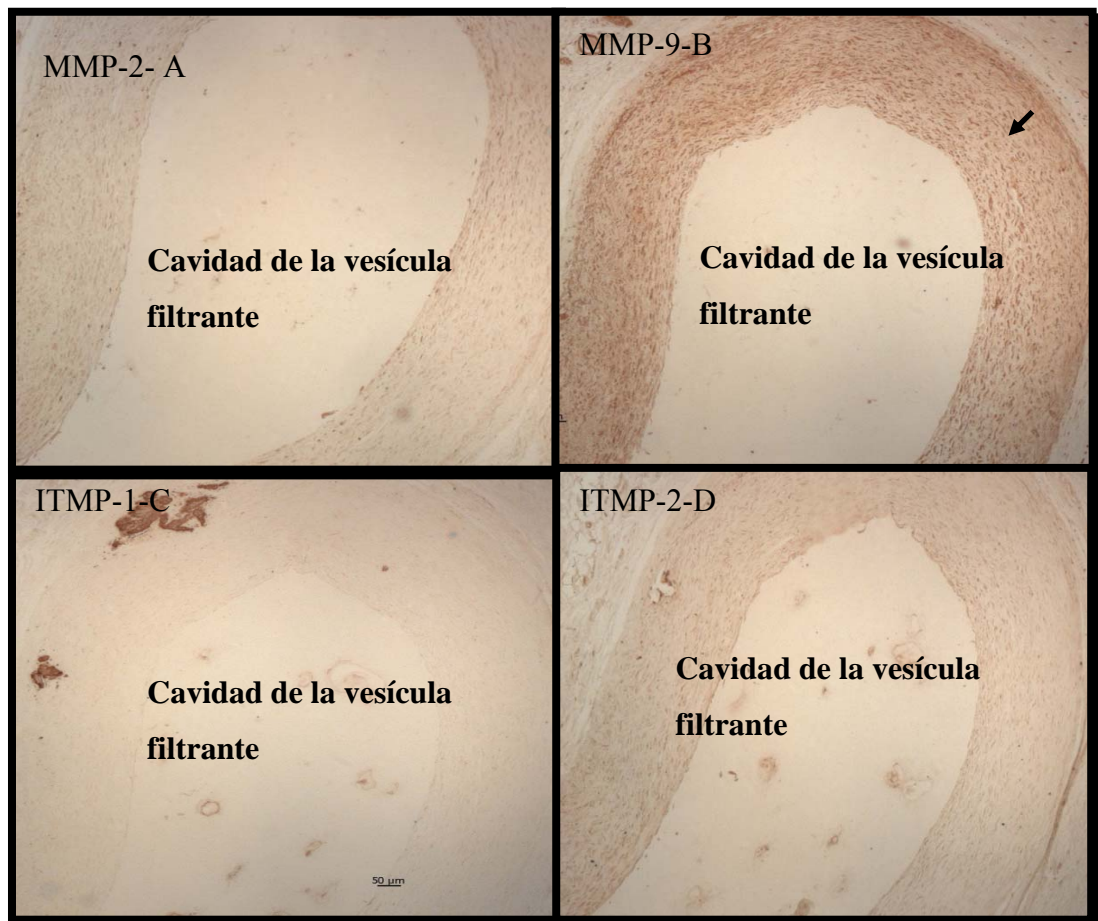


Figura 22 A, B, C, D. Inmunohistoquímica, cortes histológicos de vesícula encapsulada. En este grupo se observó una inmunorreactividad intensa de MMP-9 localizada en la capa fibrótica (flecha). La inmunorreactividad de MMP-2 y ITMP-2 fue moderada y para ITMP-1 ausente en todos los casos. X20

Grupo II: vesículas filtrantes funcionales, (n=2)

En este grupo se detectó una inmunorreactividad leve en un nivel equivalente para MMP-2, MMP-9, ITMP-1 y ITMP-2 (Imagen 23).



Imagen 23- A,B,C,D Inmunohistoquímica, cortes histológicos de vesícula funcional. En este caso la inmunorreactividad es leve y los cuatro anticuerpos la presenta en un nivel equivalente entre ellos. X20

Grupo III. Vesículas filtrantes con dehiscencia (n=5).

En este grupo, los resultados fueron muy heterogéneos. En un caso se observó una inmunorreactividad intensa de MMP-9 (Imagen 24), en el resto de los casos la inmunorreactividad fue moderada. Respecto a ITMP-1 salvo en un caso, en el resto de las muestras se observó con una inmunorreactividad moderada.

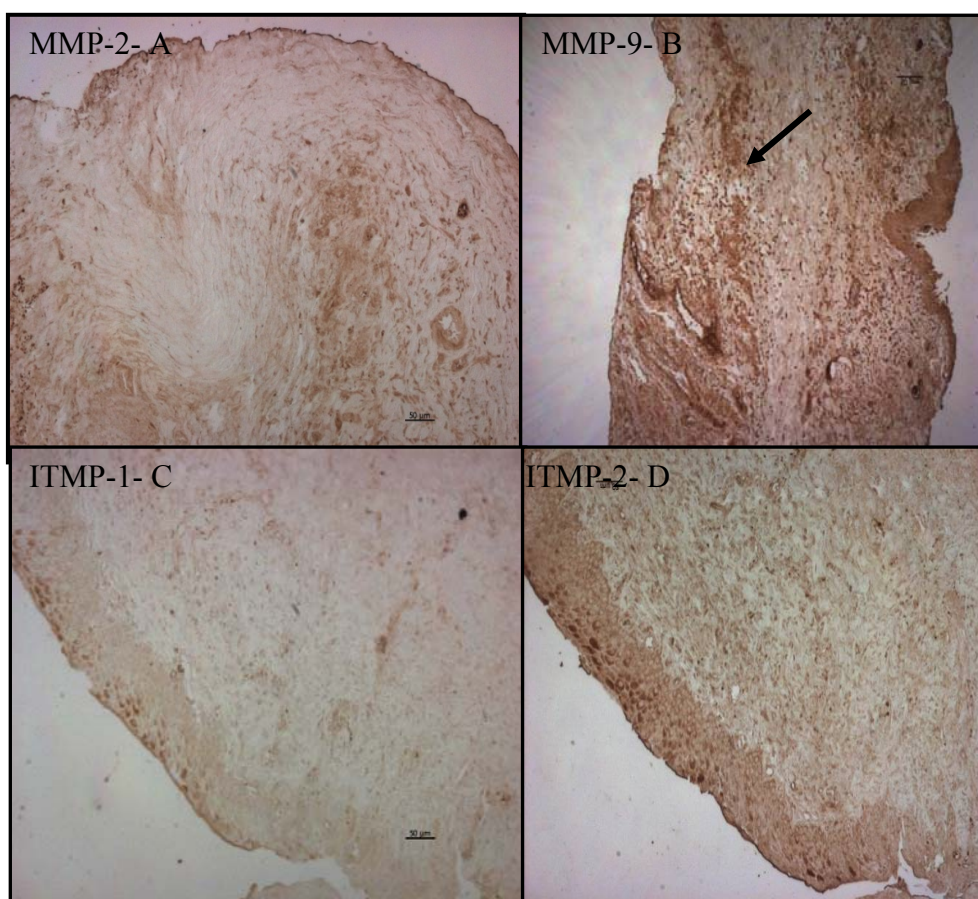


Imagen 24. Inmunohistoquímica. Vesículas con dehiscencia. Se observaron resultados heterogéneos. Con el anticuerpo MMP-9 se detectó una inmunorreactividad intensa en uno de los casos(flecha). Se observó inmunorreactividad moderada para ITMP-1 en todos los casos excepto en uno. X20.

Grupo IV. Conjuntiva de perros sanos, grupo control (n=5).

En este grupo se observó inmunorreactividad difusa débil para MMP-2 y en la capa fibrosa profunda de la sustancia propia conjuntival, (Imagen 25 A). Por otro lado la inmunorreactividad par MMP-9 y ITMP-2 fue moderada y ITMP-1 estuvo ausente en todos los casos (Figura 25 B,C,D).

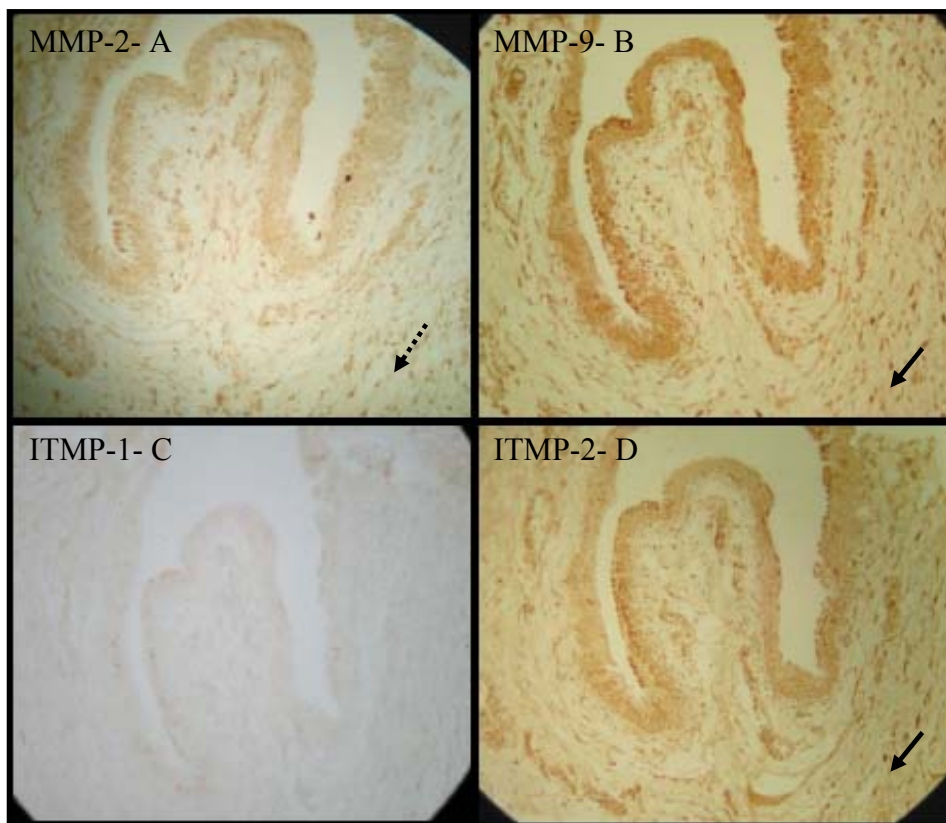


Imagen 25. Inmunohistoquímica en conjuntiva de perro sano. Se observó inmunorreacción débil para MMP-2 en la capa fibrosa profunda, flechas. La inmunorreacción para MMP-9 y ITMP-2 fue moderada. X40.

Análisis estadístico de los datos:

- a) *MMP-2*: Se comparó la inmunorreactividad de la metaloproteinasa *MMP-2* en los 4 grupos y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($p > 0.05$).
- b) *MMP-9*: Se comparó la inmunorreactividad de la metaloproteinasa *MMP-9* en los 4 grupos y se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($p < 0.01$).

Para determinar a que grupos se debían las diferencias, se realizó una prueba de comparaciones múltiples. Para las comparaciones entre dos grupos se utilizó la prueba de Mann-Whitney. Se encontraron dos diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.02$) entre el grupo de las vesículas encapsuladas y el grupo de las vesículas funcionales y entre el grupo de vesículas encapsuladas y con dehiscencia.

- c) *ITMP-1*: Se comparó la inmunorreactividad del inhibidor *ITMP-1* en los 4 grupos y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($p > 0.05$).
- d) *ITMP-2*: Se comparó la inmunorreactividad del inhibidor *ITMP-2* en los cuatro grupos y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($p > 0.05$).

IX Discusión

En el presente trabajo se describen los hallazgos clínicos, histopatológicos y de patrón de distribución de MMP-2 y 9 y ITMP-1 y 2 en las vesículas filtrantes con complicaciones de encapsulamiento y dehiscencia así como en las vesículas funcionales.

La población estudiada durante 2008 y 2010 se redujo a 17 pacientes de los cuales se detectó una mayor afección en hembras 14/17 (82.3%) sobre machos 3/17 (17.64) siendo el Cocker Spaniel la raza más representada. Este hallazgo está de acuerdo con otros estudios en los que se ha detectado una mayor prevalencia en hembras afectadas de glaucoma en el perro. Esson en 2009 describió una prevalencia del 60% en hembras y la raza más afectada en su estudio fue el Cocker Spaniel. En otro estudio Dubielzig en 2010, observó una prevalencia en hembras del 62% con el Cocker Spaniel en el 28% de los casos y el Bassett Hound en el 32% de los casos.

La complicación de vesícula encapsulada se observó a las 32.9 semanas en el período post-quirúrgico, mientras que la complicación de dehiscencia se presentó a las 34.6 semanas. De forma equivalente, Thieme en 2010, describió la formación de la vesícula filtrante encapsulada con pérdida de la función de la misma a los 6 meses del período post-quirúrgico. Esta complicación hipertensiva con vesícula encapsulada se diferencia a la fase hipertensiva asociada a la implantación de la válvula de Ahmed, en esta última, la hipertensión está asociada a edema en la pared de la vesícula, se presenta de media a los 3 meses y se resuelve gracias al uso de masaje sobre la vesícula, sin que sea necesario ningún tratamiento quirúrgico (Nouri-Mahdabi 2003).

Evaluación clínica de las vesículas filtrantes:

En el trabajo se observó diferencias estadísticamente significativas entre la morfología de las vesículas encapsuladas y el resto de los grupos estudiados ($p < 0.01$).

En el grupo I, de las vesículas encapsuladas se observó una vesícula elevada, con un aspecto terso y relativamente avascular.

La morfología de la vesícula filtrante es un indicador de su función y un posible factor de predicción de su éxito, por lo tanto existe un interés en identificar de forma clínica la presencia de encapsulamiento de la misma (Singh, 2007). Las vesículas filtrantes pueden clasificarse en función de elevación, vascularización, grosor en su pared y área de superficie (Filippopoulos, 2009). Las características clínicas descritas en las vesículas filtrantes encapsuladas en medicina humana son equivalentes a las vistas en nuestros pacientes, con un aspecto elevada en domo y en tensión (Filippopoulos et al, 2009) (Addicks, 1983). Sin embargo, en nuestro conocimiento no se ha descrito la morfología clínica de vesícula filtrante en el perro.

Se encontró una diferencia estadística ($p < 0.012$) entre la vascularización de la vesícula encapsulada y las vesículas con dehiscencia y en la inflamación de la cámara anterior entre las vesículas encapsuladas y las que se sufren dehiscencia ($p < 0.01$). Esto se podría deber al proceso inflamatorio asociado en el caso de las vesículas con dehiscencia y concuerda con los hallazgos histopatológicos de nuestros pacientes del grupo I, en los que no se observó signos de inflamación.

Sin embargo no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la relación de la PIO con la edad y grupo estudiado.

La morfología clínica de las vesículas funcionales fue evaluada en un número limitado de pacientes (n=2). En estos casos, se observó la presencia de una vesícula plana, sin bordes definidos y con un aspecto rosado. Filippopoulos et al. describe las características clínicas de una vesícula funcional con moderada elevación no demarcada, vasos sanguíneos difusos y poco marcados y sobretodo ocupando gran superficie. Sin embargo no se ha descrito ninguna morfología que asegure la funcionalidad de la misma y por tanto nuevos medios diagnósticos como la tomografía de coherencia óptica y la biomicroscopía ultrasónica se han desarrollado (Pavlin 1992)(Silva 2006).

Evaluación estudio histológico:

Entre el grupo de vesículas encapsuladas y el resto se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el patrón de distribución del colágeno ($P < 0.000$), sin embargo no hubo diferencia en el número de vasos sanguíneos.

En el grupo I de vesículas encapsuladas; el patrón de distribución fue una malla densa de colágeno perfectamente alineado con la formación de un pseudoendotelio hacia la cavidad de la vesícula y sin signos de inflamación asociados. Este patrón de distribución sólo se encontró en el grupo I y se identificó en cada uno de los casos. Estos hallazgos son compatibles con los descritos por *Thieme et al. en 2010*,

y por *Ayyala et al en 1998*, donde se encontró una gran reacción fibroblástica sin signos de inflamación asociada en las vesículas filtrantes encapsuladas en niños.

La disposición densa de las fibras de colágeno, explica el mecanismo de fallo del gonioimplante con la imposibilidad del paso del humor acuoso a través del mismo. Sin embargo otros mecanismos de fallo del gonioimplante ha sido descrito en medicina humana. *Feldam et al.* en 1997 describió dos casos de fallo de gonioimplante con presencia de una membrana de adhesión. Por su parte, *Hill et al.* y *Trigler et al.* demostraron la existencia de tejido fibrovascular obstruyendo el flujo de humor acuoso.

En el estudio del grupo de las vesículas filtrantes funcionales en este trabajo, se observó la formación de pseudoquistes intraepiteliales. Además la malla de colágeno tiene aspecto mixoide con fibras cortas sin orientación definida. Lo que permite el paso del humor acuoso a través del mismo y posterior absorción por el torrente sanguíneo. En la literatura de medicina veterinaria revisada no se han descrito los hallazgos histológicos de las vesículas funcionales. Sin embargo distintos autores en medicina humana han descrito sus características histológicas. *Loeffler et al.* describió una vesícula funcional asociada a gonioimplante tipo Molteno, en este caso se observó tejido necrótico rodeando el implante con lo que postuló un posible efecto tóxico del humor acuoso como fuente de alteración en el tejido conectivo. *Philipp et al.* describió la presencia de espacios quísticos en la pared de la vesícula. Por último *Molteno et al.* ha estudiado y caracterizado en distintos trabajos la formación de la vesícula filtrante funcional asociada al gonioimplante de Molteno, su hipótesis se basa en la formación dinámica de la misma durante toda la vida de la vesícula. En las vesículas funcionales se describe

un epitelio conjuntival normal aunque más fino o atenuado y un aspecto mixoide de la malla de colágeno con unas fibras cortas y sin patrón de orientación definido (Addicks et al. 1983).

En el grupo de las vesículas filtrantes con dehiscencia, se encontró un patrón de disposición del colágeno irregular con fibras cortas. Además en los todos los casos se observa un infiltrado inflamatorio en el estroma anterior así como vascularización intensa. En este grupo, el hallazgo más característico fue el proceso inflamatorio, y por tanto se trata de signos inespecíficos. Los hallazgos histopatológicos en vesículas con dehiscencia descritos por *Filippopoulos et al.* son; aumento en el número de vasos e infiltrado celular en el estroma conjuntival.

Patrón de distribución de MMPs y ITMPs:

Se encontró inmunoreactividad positiva MMP-2, MMP-9 y ITMP-2 en la conjuntiva normal en los casos estudiados, sobretodo localizada en las células epiteliales conjuntivales, mientras que la reacción en la capa fibrosa del estroma conjuntival fue limitada. La inmunoreactividad de ITMP-2 en conjunción con MMP-2 y MMP-9 en el tejido conjuntival normal apoya la idea de que las proteinasas endógenas existen en tejido sano en un equilibrio con los factores inhibidores, lo cual está de acuerdo con resultados recientes en córnea en caballos (Boveland 2010). El equilibrio entre las MMPs y ITMPs es imprescindible para mantener el equilibrio entre la producción de la matriz extracelular y su degradación (Boveland 2010).

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la inmunoreactividad de MMP-2, ITMP-1 y ITMP-2 entre los distintos grupos: Es decir, las vesículas encapsuladas, funcional, con dehiscencia y conjuntiva de perros sanos. Sin embargo, hubo diferencias estadísticamente significativas en la expresión de MMP-9 entre el grupo de vesículas encapsuladas y las vesículas funcionales y entre el grupo de vesículas encapsuladas y las que presentaban dehiscencia. Las vesículas encapsuladas presentan una inmunorreactividad intensa localizada en el núcleo de los fibroblastos en la capa fibrótica.

La cirugía filtrante en glaucoma, resulta en una inflamación post-quirúrgica, algunos de los mediadores del proceso cicatricial en la vesícula filtrante han sido identificados, incluyendo el factor de crecimiento transformante $\beta 2$ (FCT- $\beta 2$) y el factor de crecimiento del tejido conectivo (FCTC). Esson et al, describieron un incremento en la frecuencia de vesícula filtrantes encapsuladas cuando se inyectaba FCTC en un modelo experimental en la rata (Esson, 2004). Por otro lado, en la fase tardía del proceso cicatricial es en la que se produce la reorganización y contracción de las fibrillas de colágeno. Esta fase está mediada por las metaloproteinasas, así una sobreexpresión de las mismas se ha asociado a una cicatrización excesiva en los tejidos oculares (Wong, 2003)(Sherwood, 2006).

A partir de estudios de expresión genética en el modelo experimental en la rata, se observó una sobre-expresión de las metaloproteinasas MMP-2, 3 y 9 en la fase tardía de la cicatrización, cuando la reorganización fibrilar del colágeno y otras proteínas de matriz es realizada. En el presente estudio, se observó una inmunorreactividad intensa de MMP-9 en las vesículas encapsuladas comparada con el resto de grupos, mientras que la expresión de ITMP-1 estaba muy reducida.

Este patrón de expresión se ha descrito en enfermedades inflamatorias de la esclera, como la escleritis necrotizante y puede representar una alteración en el equilibrio entre las MMPs y sus inhibidores tisulares ITMP (Di Girolamo, 1997).

En otros estudios, se ha demostrado el papel modulador de los ITMPs en el proceso cicatricial en la cirugía filtrante. El fármaco Iiomastat es un inhibidor de la metaloproteinasa ITMP de amplio espectro. *Wong et al.* demostró un aumento en la supervivencia de la vesícula filtrante cuando Iiomastat fue aplicado tópicamente (Wong 2002, 2003 y 2005). En otro estudio *Scott et al.* demostraron que se inhibía la contracción de las fibras de colágeno por el uso tópico de ITMPs (Scott 1998). Los resultados de estos estudios sugieren que el proceso de cicatrización puede ser modulado en el período post-operatorio gracias al uso de los ITMPs.

El control de la expresión de MMP y ITMP podría ayudar a controlar el proceso de cicatrización del tejido conjuntival y del tejido conectivo subconjuntival y por tanto beneficiar e incrementar el éxito de la cirugía filtrante en el perro.

X Conclusiones

1. Se definieron las características clínicas de las vesículas filtrantes encapsuladas en el perro.
2. En los hallazgos histopatológicos se determinó el patrón de distribución del colágeno característico en los distintos grupos estudiados: vesícula encapsulada, vesícula con dehiscencia y vesícula funcional. Además se definió en el perro las características histopatológicas de las vesículas filtrantes encapsuladas.
3. Se encontró una inmunorreactividad intensa de MMP-9 en la vesícula encapsulada comparada con la vesícula con dehiscencia y la funcional. Este patrón de expresión puede representar una alteración del equilibrio entre la expresión MMP y ITMP la cual es una de las vías esenciales de renovación del colágeno.

XI.ABREVIATURAS

CA	Cámara anterior
ITMP	Inhibidor tisular de la metaloproteinasa
FCT- β2	Factor de crecimiento transformante B2
FCTC	Factor de crecimiento del tejido conectivo
5-FU	5- Fluoruracilo
MMC	Mitomomicina C
MMP	Metaloproteinasa
OS	Ojo izquierdo
OD	Ojo derecho
PIO	Presión intraocular

XII. Bibliografia

- 1.-Addicks EM, Quigley HA, Green WR, Robien AL. Histologic characteristics of filtering blebs in glaucomatous eyes. *Archives of Ophthalmology* 1983; 101: 795-798.
- 2.- AGIS Investigators. The Advanced Glaucoma Intervention Study (AGIS). The relationship between control of intraocular pressure and visual field deterioration. *Am J Ophthalmol* 2000; 130: 429-440.
- 3.- Ahmed M. Ahmed valve surgery In: *Surgical Techniques in Ophthalmology Series: Glaucoma Surgery*. Teresa Chen Editor, Saunders Publishing, Boston USA, 2008, 46-60.
- 4.- Aubin ML, Powell CC, Gionfriddo JR *et al.* Ultrasound biomicroscopy of the feline anterior segment. *Veterinary Ophthalmology* 2003; 6(1): 15–17.
- 5.-Ayyala RS, Zurakowski D, Smith JA, A clinical study of the Ahmed glaucoma valve implant in advanced glaucoma. *Ophthalmology* 1998; 105:1968–76.
- 6.-Ayyala RS, Michelini-Norris B, Flores A, Haller E, Margo CE. Comparison of different biomaterials for glaucoma drainage devices: part 2. *Arch Ophthalmol*. 2000 Aug;118(8): 1081-4.
- 7.- Baker AH, Edwards DR, Murphy G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *Journal of Cell Science* 2002; 115: 3719-3727.
- 8.-Bentley E., Miller P. et al. Combined cycloablation and gonioimplantation for the treatment of glaucoma in dogs:18 cases (1992-1998) *J Am Vet Med Assoc* 1999 15;215(10):1469-72.
- 9.- Brooks, D.E., A.M. Komaromy, and M.E. Kallberg, Comparative optic nerve physiology: implications for glaucoma, neuroprotection, and neuroregeneration. *Vet Ophthalmol*, 1999; 2(1): 3-25.
- 10.- Brooks, D.E., A.M. Komaromy, and M.E. Kallberg, Comparative retinal ganglion cell and optic nerve morphology. *Vet Ophthalmol*, 1999; 2(1): 3-11.
- 11.-Boveland SD, Moore PA, Mysore J, Krunkosky, Dietrich UM, Jarret C, Carmichael KP. Immunohistochemical study of matrix metalloproteinases 2 and 9,

macrophage inflammatory protein-2 and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases 1 and 2 in normal purulonecrotic and fungal infected equine corneas. *Vet Ophthalmol* 2010; 13,2: 81-90.

12.-Chintala SK, Wang N, Diskin S, Mattox C, Kagemann L, Fini ME, Schuman JS. Matrix metalloproteinases gelatinase B is associated with leaking glaucoma filtering blebs. *Exp Eye Res.* 2005; 81: 429-436.

13.-Cook CS. Surgery for glaucoma. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*1997; 27: 1109–112 .

14.- Crumley W., Gionfrido JR, Radecki SV. Relationship of the iridocorneal angle, as measured using ultrasound biomicroscopy, with post-operative increases in intraocular pressure post-pahocemulsification in dogs. *Vet Ophthalmol* 2009; 12,1: 122-7.

15.- Debry PW, Perkins TW, Heatley G, et al. Incidence of late-onset bleb-related complications following trabeculectomy with mitomycin. *Arch Ophthalmol.* 2002; 120: 297–300.

16.-Di Girolamo N, Lloyd A, McCluskey P, Filipic M, Wakefield D. Increased expression of matrix metalloproteinases in vivo in scleritis tissue and in vitro in cultured human scleral fibroblasts. *American Journal of Pathology.* 1997 Feb;150(2):653-66.

17.-Dubielzig, R.R., et al., *The Glaucomas*, in *Veterinary Ocular Pathology: a comparative review*. R. Dubielzig Ed. Saunders Elsevier. 2010p. 419-448.

18.-Eibschitz-Tsimhoni M, Schertzer RM, Mush DC, Moroi SE. Incidence and management of encapsulated cyst following Ahmed glaucoma valve insertion. *Journal of Glaucoma* 2005; 14: 276-279.

19.-Esson D. Updates in Surgical Management of the Canine Glaucomas. Personal presentation 41 American College of Veterinary Ophthalmology 2009, Chicago USA.

20.-Esson DW, Neelakantan, Iyer SA, Blaock TD, Balasubramanian L, Grotendorst GR, Schultz GS, Sherwood MB. Expression of connective tissue growth factor after glaucoma filtering surgery in a rabbit model. *Investigative in Ophthalmology and Visual Science.* 2004; Feb; 45(2): 485-91.

21.-Feldman RM, el-Harazi SM, Villanueva G. Valve membrane adhesion as a cause of Ahmed glaucoma valve failure. *Journal of Glaucoma.* 1997; 6:10-12.

- 22.-Filippopoulos T, Hanna E., Chen T., Grosskreuts C., Jakobiec F., Pasquale L R., Correlation of filtration bleb morphology with histology. *International Ophthalmology Clinics*, 2009; Volume 49: 1,71-82.
- 23.- Francis BA, Lee TD, Najafi K, Murthy R, Kurumety U, Rao N, Minckler DS. Histopathologic features of conjunctival filtering blebs. *Archives of Ophthalmology* 2005; 123 (2): 166-170.
- 24.-Garcia GA, Brooks DE, Gelatt KN, Gil F, Whitley RD. Evaluation of valved and nonvalved gonioimplants in 83 eyes of 65 dogs with glaucoma. *Anim Eye Res*. 1998; 17 (1.2): 9-16.
- 25.-Gelatt KN, Brooks DE, Källberg ME. The Canine Glaucomas In: *Veterinary Ophthalmology* Kirk N. Gelatt Editor, Blackwell Publishing, Iowa, USA, 2007, 753-811.
- 26.- Gelatt KN, Brooks DE, Samuelson DA. Comparative glaucomatology II: the experimental glaucomas. *Journal of Glaucoma* 1998; 7: 282–294.
- 27.-Gil-Carrasco F, Salinas-van Orman E, Recillas-Gispert C, Ahmed valve implant for uncontrolled uveitic glaucoma. *Ocul Immunol Inflamm* 1998; 6: 27-37.
- 28.-Grubelnik V, Marhl M, Drop formation in a falling stream of liquid. *Am. J. Phys.* 2005; 73 (5): 415-419.
- 29.-Heijil A, Leske MC, Bengtsson Bo, Hymon L, Bengtsson B, Hussein M. For the early manifest glaucoma trial group: reduction of intraocular pressure and glaucoma progression. *Archives of Ophthalmology* 2002; 120: 1268-1279.
- 30.-Hill RA, Pirouzian A, Liaw L. Pathophysiology of and prophylaxis against late ahmed glaucoma valve occlusion. *American Journal of Ophthalmology*. 2000;129:608-612.
- 31.-Jones LS, Rajesh K, Spaeth S, Spaeth G Trabeculectomy In: *Surgical Techniques in Ophthalmology Series: Glaucoma Surgery*.Teresa Chen Editor, Saunders Publishing, Boston USA, 2008, 46-60.
- 32.-Kawashima Y, Saika S, Yamanaka O, Okada Y, Ohkawa K, Ohnishi Y. Immunolocalization of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human subconjunctival tissue. *Current eye research* 1998, 17: 445-451.
- 33.-Loeffler KU, Jay JL. Tissue response to aqueous drainage in a functioning Molteno implant. *Brithish Journal of Ophthalmology*. 1988; 72: 29-35.
- 34.- Lloyd MA, Minckler DS, Heuer DK. Echographic evaluation of glaucoma shunts. *Ophthtalmology* 1993; 100: 919.

- 35.-Mandal M, Mandal A, Das S. Clinical implications of matrix metalloproteinases. *Molecular Cell Biochemistry* 2003;252:305-329.
- 36.-Martinez-Bello, C., Pazos, MCB.; Pérez, R., Martínez, A.; Sánchez-Salorio, M. Exploración bioultrasónica (BMU) en la cirugía del glaucoma. *Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología* 1999 Dec LXXIV(12)
- 37.-McCluskey P, Molteno A, Wakefield D, Di Girolamo N. Otago Glaucoma Surgery Outcome Study: The pattern of expression of MMPs and TIMPs in bleb capsules surrounding Molteno Implants. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2009; 50 (5): 2161-2164.
- 38.-Molteno AC, Suter AJ, Fenwick M, Bevin TH, Dempster AG. Otago Glaucoma Surgery Outcome Study: Cytology and Immunohistochemical Staining of Bleb Capsules around Molteno Implants. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, May 2006; Vol. 47, No. 5 1975-1980.
- 39.-Nagase H., Woessner JF. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999;274(31),21491-21494
- 40.- Pavlin CJ, Harasiewicz K, Eng P *et al.* Ultrasound biomicroscopy of anterior segment structures in normal and glaucomatous eyes. *American Journal of Ophthalmology* 1992; 113 381-389.
- 41.-Philipp W, Klima G, Miller K. Clinicopathological findings 11 months after implantation of functioning aqueous-drainage silicone implant. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 1990; 228:481-486.
- 42.-Quigley HA. Editorial. Chase the family. *Arch Ophthalmol.* 2006; 124: 1036-1037.
- 43.-Ruderman JM. Revising the failing filtration bleb. *Techniques in Ophthalmology* 2005; 3: 133-137.
- 44.-Sapienza J.S., van der Woerd A. Combined transscleral diode laser cyclophotocoagulation and Ahmed gonioimplant in dogs with primary glaucoma 51 cases (1996- 2004). *Veterinary Ophthalmology* 2005;8,2:121-127.
- 45.-Schwartz AL, Van Veldhuisen PC, Gaasterland DE *et al.* The Advanced Glaucoma Intervention Study: 5. Encapsulated Bleb after initial trabeculectomy. *Am J Ophthalmol.* 1999; 127:8-19.
- 46.-Scott KA, Wood EJ, Karran EH. A matrix metalloproteinase inhibitor which prevents fibroblast-mediated collagen lattice contraction. *FEBS Lett.* 1998; 441:137-140.
- 47.-Seo JH, Park KH, Kim YJ, Yoo YC, Kang SH, Kim DM. Differences in the histopathology and matrix metalloproteinases expression in Tenon's tissue of

primary open-angle glaucoma and primary angle-closure glaucoma. *Korean Journal of Ophthalmology* 2008; 22: 37-42.

48.-Sherwood MB. A sequential multiple-treatment, targeted approach to reduce wound healing and failure of glaucoma filtration surgery in a rabbit model. *Trans Am Ophthalmol Soc*, 2006; 104:478-492.

49.-Silva M., Moragrega E., Gil F. Evaluation of filtering blebs with UBM and correlation with IPO control. XXI Congress of the International Society of Ophthalmic Ultrasound. Proceeding. Lima, Perú, 3-7 Septiembre, 2006.

50.-Singh M., Chew PT, Friedman DS, Nolan WP, See JL, Smith SD, Zheng C, Foster PJ, Aung T. Imaging of trabeculectomy blebs using anterior segment optical coherence tomography. *Ophthalmology*. 2007, 114 (1) , 47 - 53.

51.-Sivak JM, Fini EM. MMPs in the eye: emerging roles for matrix metalloproteinases in ocular physiology. *Progress in Retinal and Eye research* 2002, 21;1-14.

52.-Skuta GL, Beeson CC, Higginbotham EJ, et al. Intraoperative mitomycin versus postoperative 5-fluorouracil in high-risk glaucoma filtering surgery. *Ophthalmology*.1992; 99: 438-444.

53.-Soltau JB, Rothman MD, Budenz DL, Greenfield DS, Feuer W, Liebman JM, Ritch R. Risk factors for Glaucoma Filtering bleb infections. *Arch Ophthalmol* 2000;118:338-342

54.-Tadashi I, Hiroshi O, Kazubisa M, Ikuyo O, Mitsuru N Effects of antiglaucoma drops on MMP and TIMP. *IOVS* 2006; 47:3 823-830 .

55.-Trigler L, Proia AD, Freedman SF. Fibrovascular ingrowth as a cause of Ahmed glaucoma valve failure in children. *American Journal of Ophthalmology*. 2006;141:388-389.

56.-Weinstein WL, Dietrich U M, Sapienza JS, Carmichael KP, Moore PA, Krunkosky T M. *Veterinary Ophthalmology* 200710, Supplement 1, 108-116.

57.-Wong TTL, Sethi C, Daniels JT, Limb GA, Murphy G, Khaw PT. Matrix metalloproteinases in disease and repair processes in the anterior segment. *Survey of Ophthalmology* 2002; 47: 239-256.

58.-Wong TTL, Mead AL, Khaw PT. Prolonged Antiscarring Effects of Ilomastat and MMC after Experimental Glaucoma Filtration Surgery. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 2005; 46: 2018-2022.

59.-Wong TTL, Mead AL, Khaw PT. Matrix metalloproteinase inhibition modulates postoperative scarring after experimental glaucoma filtration surgery. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 2003; 44: 1097-1103.