

**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

El Sistema GABAérgico Retiniano

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de
Ciencias Biológicas

Autora: Lic. Carolina Ofir Jaliffa

Directora de tesis: Prof. Dra. Ruth Estela Rosenstein

Consejero de Estudios: Prof. Dr. Esteban Hasson

Lugar de trabajo: Laboratorio de Neuroquímica Retiniana y Oftalmología Experimental, Dpto. de
Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, UBA.

Ciudad Autónoma de Buenos Aires
Febrero de 2005

El Sistema GABAérgico Retiniano

El Sistema GABAérgico Retiniano

Resumen

En este trabajo de Tesis se demostró que la liberación de GABA en la retina de hámster puede involucrar tanto un mecanismo vesicular, como un mecanismo mediado por transportador. En esta especie, se identificaron células GABAérgicas con morfología y localización compatibles con células amácrinas, amácrinas desplazadas y células horizontales. El GABA incrementó significativamente el contenido de melatonina en la retina de hámster. Asimismo, se demostró que la actividad GABAérgica retiniana varía circadianamente aún en condiciones constantes de iluminación ambiental. Se obtuvieron evidencias que sugieren que el sistema GABAérgico retiniano podría modular la actividad circadiana de los núcleos supraquiasmáticos. Por otro lado, se demostró que la melatonina es un activador del sistema GABAérgico retiniano tanto a nivel pre- como postsináptico y que los neuroesteroides, probablemente de origen local, afectan la neuroquímica retiniana y la actividad electrorretinográfica, en forma significativa. También se demostró una alteración en el campo visual así como en el electrorretinograma escotópico de pacientes epilépticos tratados con una droga que aumenta los niveles de GABA. Y por último, se demostró una disminución en la actividad GABAérgica en un modelo de glaucoma experimental en ratas. En suma, en el marco de esta Tesis, se han obtenido nuevas evidencias que avalan la relevancia del sistema GABAérgico en la fisiopatología retiniana.

Palabras claves: retina, GABA, melatonina, ritmos circadianos, neuroesteroides, ERG, vigabatrina, glaucoma.

The Retinal GABAergic System

Summary

In the present work, it was demonstrated that GABA release mechanism in the hamster retina could involve both vesicular and carrier-mediated mechanisms. In this species, GABA was localized in amacrine cells, displaced amacrine cells and horizontal cells. GABA significantly increased melatonin content in the hamster retina. In addition, the existence of daily rhythms in the GABAergic activity that persisted even in constant light conditions was shown. Retinal GABAergic activity could modulate the circadian activity of the suprachiasmatic nuclei. On the other hand, it was demonstrated that melatonin increased the retinal GABAergic system at both pre- and postsynaptic levels, and that neurosteroids, presumably from local origin, significantly regulate retinal neurochemistry and electroretinographic activity. In addition, an alteration in the visual field as well as in the scotopic electroretinogram was described in a population of Argentinean epileptic patients treated with vigabatrin. Finally, in an experimental model of glaucoma in rats a significant decrease of the GABAergic activity was demonstrated. In summary, in the context of the present thesis, new evidences that support the relevance of GABA in retinal patho-physiology were obtained.

Key words: retina, GABA, melatonin, circadian rhythms, neurosteroids, ERG, vigabatrin, glaucoma.

Agradecimientos

- ❖ A Ruth por hacer compatibles mis tiempos con los de la vida real, por todos los momentos compartidos, por todo lo aprendido y por querer lo mejor para mí. Muchas, muchas gracias.
- ❖ A Inés por su persistencia y aceleración natural, por tratarme y quererme como a sus hijos.
- ❖ A Daniel por sus mates, por las charlas de la mañana temprano y porque siempre tiene la solución práctica para todo problema que pueda existir sobre el planeta. A Mónica porque estuvo en el lugar preciso y en el momento exacto. A Ceci por tener siempre las ideas claras e insistir. A Pablo por su amistad. A Ezequiel por la energía que tiene para hacer cualquier tipo de “ejercicio”. A Andrea por acercarme al mundo de la divulgación a pesar de mi resistencia. A Geraldine por las alegrías y angustias compartidas. A Julieta, Luciana y Pablo Franco por esos momentos compartidos. A Victoria por cuidar mis animalitos “de” mí. A Sarah por tener que soportar la mayor parte de mis incomprensibles explicaciones en mi propio idioma, por su fuerza y entusiasmo, por sus preguntas y por todo lo que aprendí tratando de explicarle (*so much than “overwrite”!*). A Walter por toda su dulzura. Y a Nuria por marcarme el fin de una etapa.
- ❖ A Diego Golombek infinitas gracias por todo lo que hizo por mí, desde las cartas de recomendación, pasando por el licor de chocolate, hasta por preocuparse por mi futuro. A Gaby por marcarme el camino, por haber compartido mesadas, seminarios, congresos y por seguir presente. A Fito, Santi, Luciano, PatoA, PatoO, Juliana, Haldrich, Fernanda, Viru y Sergio por el esfuerzo que hicieron para darme los cuatro canales del fondo.
- ❖ A Cora y cia., con quienes compartiendo espacios aprendimos a querernos.
- ❖ Al los doctores Croxatto, J.J. Lopez y Jorge Golstein por introducirme al mundo de la microscopía.
- ❖ A Hernán Aldana por todo su apoyo, allá en el lejano oeste.
- ❖ A Cristian por acercarme de la mejor forma posible al mundo de los pacientes y fundamentalmente por levantarme el ánimo.
- ❖ A la Dra. Silvia Kochen y todo su equipo por la colaboración lograda. Y a los pacientes, por venir.
- ❖ Al Dr. Pablo Arias y todo su grupo por los seminarios y reuniones compartidas. Y por las correcciones!
- ❖ A Adalí (con quien comparto un idioma bastante particular) que puso en mis manos un *paper* de un tal Dr. Marc Abitbol que definió mi siguiente paso académico, el postdoctorado, y le dio a todo este proyecto que hoy termina un gran sentido.
- ❖ A Ce por bancarme a cada minuto y poder comprender la magnitud de los éxitos y fracasos día a día. Y por darme el empujoncito que me faltaba para terminar la última etapa. Entre

muchas otras cosas.

- ❖ A todos los que alguna vez pasaron por el laboratorio Laura Grilli, Analía de Nichilo, Alejandro Murad, Esteban, Ojos, Penny, etc.
- ❖ A las que sin saberlo fueron marcando mi camino, dentro y fuera del laboratorio: Paola Yiannelli, Paula Faillace y Gabriela Ferreyra. Muchas gracias por todo lo que hicieron antes y durante mi estadía en este lugar del mundo.
- ❖ A Osvaldo, Elida, Claudia, Edgardo, Roberto, Jesús y todos.
- ❖ A Vanina que supo alentarme y/o calmarme o, simplemente, escucharme desde el principio de este proyecto hasta HOY. Por el resto, ya lo sabe.
- ❖ A mamá y papá por tener tanta confianza en mí y por haberme traído a este mundo. A mi abuela Irma por su apoyo emocional y a mi abuela Ofir por el apoyo espiritual. A Natalia y Hernán por escucharme y contenerme. A Pablo por permitirme la “codirección” de su tesis. A Daniela, mi hermanita, por arrastrarme los sábados por las noches. A mis tías y tíos. A Lautaro, Lucila, Mora, Carla y Julia por sus preguntitas un poco malignas y curiosas “y, ¿cómo andan los hámsters, cuántos mataste?”, “¿ya descubriste cómo funciona EL RELOJ?” y lograban que les explicara con gusto todo lo que hacía en el laboratorio. Gracias por preguntarme y escucharme.
- ❖ A mis amigos Pao, Claudia, Mariana, Stella (Raúl y Juana), Evangelina, Piky, Cecilia, Yani, Ele Ezequiel, Nico y Aro y por todos los momentos compartidos durante estos años, por distraerme de mi trabajo y ayudarme a ser quien soy.
- ❖ A Alejandra Abdala por la fuerza que me dio su recuerdo y porque ella también hubiera podido llegar.
- ❖ A Esteban que me ayudó en este último tiempo, luego de que nuestras vidas se cruzaran inesperadamente y que me soportó intentando ser una persona adulta que toma decisiones y elige su propio camino. GRACIAS.
- ❖ Al CONICET y a la Agencia de Promoción Científica y Tecnológica por las becas que me otorgaron
- ❖ Al CONICET, a la Agencia de Promoción Científica y Tecnológica, a la Fundación Antorchas y a la Fundación Sigm Xi por los subsidios recibidos.
- ❖ A la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires por permitirme realizar mi trabajo de tesis en este lugar.

A toda mi gran familia

Índice

ABREVIATURAS	12
INTRODUCCION	15
1. La Retina	16
a. Mecanismo De Fototransducción	18
2. El GABA en la Retina	21
a. Biosíntesis Y Metabolismo del GABA	24
b. Mecanismo de Liberación del GABA en la Retina	25
3. La Melatonina en la Retina de Vertebrados	26
a. Biosíntesis y Metabolismo de la Melatonina	27
b. Regulación de la Melatonina Retiniana	29
c. Funciones de la Melatonina en la Retina	30
4. Ritmos Y Relojes Circadianos	32
a. Mecanismo de Sincronización	34
b. La Retina Como Reloj Circadiano Autónomo	36
5. Neuroesteroides en el Sistema Nervioso Central	39
a. Mecanismo de Acción de Neuroesteroides	40
6. Disfunciones Visuales	44
a. Asociadas al uso de la Droga Antiepiléptica Vigabatrina	44
b. El Glaucoma	45
OBJETIVOS	50
MATERIALES Y METODOS	52
1. Animales y Pacientes	53
1.1. Hámsteres	53
1.2. Ratas	53
1.3. Pacientes	54
2. Manipulaciones <i>in vivo</i>	54

2.1. Inyecciones intravítreas (i.v.)	54
2.2. Inyecciones en la cámara anterior	54
2.3. Determinación de la PIO	55
2.4. Registro de actividad locomotora	55
3. Determinación de parámetros GABAérgicos	56
3.1. Determinación de la liberación dinámica de [³ H]-GABA	56
3.2. Determinación de la liberación de GABA endógeno	57
3.3. Determinación de la liberación estática de [³ H]-GABA	57
3.4. Ensayo de radiorreceptor para GABA	58
3.5. Determinación del <i>turnover</i> de GABA	59
3.6. Determinación del influjo de [³⁶ Cl] ⁻	59
3.7. Determinación de la actividad glutámico descarboxilasa	60
3.8. Ensayo de <i>binding</i> de [³ H]-GABA	60
3.9. Determinación de la captación específica de [³ H]-GABA	61
3.10. Estudios inmunohistoquímicos para la detección de GABA	62
3.11. Microscopía electrónica para la detección de GABA	62
4. Determinación del contenido de melatonina	63
5. Determinación del citocromo P450 _{sc}	64
5.1. Western blot	64
5.2. Estudio inmunohistoquímico	64
6. Microscopía óptica y análisis de imágenes de la retina y nervio óptico de rata	65
7. Electrorretinograma en hámsteres y ratas	67
8. Examen oftalmológico en pacientes epilépticos	68
8.1. Campos Visuales en pacientes epilépticos	68
8.2. Electrofisiología en pacientes	69
9. Análisis estadístico	70

RESULTADOS	71
1. Mecanismo de liberación de GABA en el hámster dorado	72
2. Localización de GABA en la retina de hámster dorado	75
3. Regulación GABAérgica del contenido de melatonina en la retina del hámster	77
4. Actividad circadiana del sistema GABAérgico retiniano	80
a. Variaciones diarias en la actividad GABAérgica retiniana	80
a. Variaciones diarias de parámetros GABAérgicos en condiciones de oscuridad constante	85
b. Participación del sistema GABAérgico retiniano en la respuesta circadiana a la luz	87
5. Modulación del sistema GABAérgico	88
a. Efectos de la melatonina sobre la neurotransmisión GABAérgica en la retina de hámster	88
b. Efectos de los neuroesteroides sobre el sistema GABAérgico retiniano	88
6. El sistema GABAérgico bajo condiciones patológicas	95
a. Pacientes epilépticos tratados crónicamente con VGB	95
b. Participación del sistema GABAérgico en el glaucoma experimental	103
DISCUSIÓN	100
A. Caracterización del sistema GABAérgico retiniano	101
B. Estudio del sistema GABAérgico retiniano en condiciones patológicas	132
a. Disfunciones visuales asociadas a uso de una droga antiepiléptica	132
b. Estudio de la actividad del sistema GABAérgico en animales con hipertensión ocular	138
CONCLUSIONES	147
BIBLIOGRAFÍA	150

Abreviaturas

AAAD: descarboxilasa de aminoácidos aromáticos
AH: ácido hialurónico
AMPc: adenosina monofosfato cíclico
ANOVA: análisis de varianza
APV: ácido D-(-)-2-amino-5-fosfonopentanoico
B_{máx}: concentración máxima de sitios de unión
BSA: seroalbúmina bovina
CACA: ácido *cis*-4-aminocrotónico
CAMP: ácido carboxílico *cis*-2-aminometil-cicloproprano
CBZ: carbamazepina
CCG: capa de células ganglionares
cd: candelas
Ci: Curie
CNE: capa nuclear externa
CNI: capa nuclear interna;
CPE: capa plexiforme externa
CPI: capa plexiforme interna
CT: tiempo circadiano (*circadian time*)
DAB: diaminobencidina
DHEAS: dehidroepiandrosterona sulfato
DNQX: 6,7-dinitroquinnoxaline-2,3-dione
dpm: desintegraciones por minuto
EGTA: ácido etilenebis(oxietilenoitrilo)-tetraacético
EPR: epitelio pigmentario de la retina
ERG: electroretinograma
ES: error estándar
GABA: ácido gama-aminobutírico
GABA-T: GABA-transaminasa
GAD: glutamato descarboxilasa
GAGs: glicosaminoglicanos
GAT: transportador de GABA
GDP: guanosina difosfato
GMPc: guanosina monofosfato cíclico
5'-GMP: 5'-guanosina monofosfato
GTP: guanosina trifosfato
h: hora
HIOMT: hidroxindol-O-metiltransferasa
HRP: peroxidasa de rábano
5-HT: serotonina
Hz: herzio
i.p.: intraperitoneal
i.v.: intravítrea
IgG: inmunoglobulina G
K_d: constante de disociación
K_m: constante de Michaelis-Menten
L-O: luz-oscuridad
MEM: medio esencial mínimo
min: minutos
NAT o AANAT: serotonina N-acetiltransferasa
NEs: neuroesteroides
NMDA: N-metil-D-aspartato
NO óxido nítrico

NOS: óxido nítrico sintasa
NSQ: núcleos supraquiasmáticos
O-O: oscuridad constante
P450_{scc}: citocromo P450 que cataliza la escisión de la cadena lateral del colesterol
PAP: complejo peroxidasa-antiperoxidasa
PBS: buffer con 100 mM de fosfato de sodio y 100 mM de NaCl
PFA: paraformaldehído
PIO: presión intraocular
PMSF: fluoruro de fenil-metil-sulfonilo
POEs: potenciales occipitales evocados
PRC: curva de respuesta de fase (*phase response curve*)
prot: proteínas
PS: pregnenolona sulfato
PVDF: polifluoruro de vinilideno
RIA: radioinmunoanálisis
rpm: revoluciones por minuto
s: segundos
SNC: Sistema Nervioso Central
SOD: superóxido dismutasa
TBPS: terbutilciclofosforotionato
TCA: ácido tricloroacético
THDOC: tetrahidrodesoxicorticosterona
TPMPA: ácido 1,2,5,6-tetrahidropiridina-4-metilfosfónico
TTBS: buffer con 1% de BSA en 0,05% de Tween 20, 0,15 M de NaCl y 50 mM de Tris-HCl
VGB: γ -vinilGABA, vigabatrina
V_{máx}: velocidad máxima
ZT: Zeitgeber time

Introducción

1. LA RETINA

La retina codifica el mundo visual, transformando los estímulos luminosos en impulsos nerviosos que son enviados al cerebro. En la corteza, las señales son interpretadas y configuran la percepción visual: una sensación subjetiva de la forma, el color, la profundidad, el movimiento de los objetos y el espacio que nos rodea. La retina es una lámina fina de tejido nervioso situada en el fondo del ojo, que constituye una prolongación del sistema nervioso central (Figura 1).

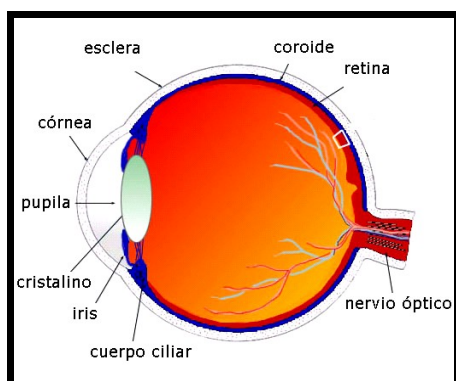


Figura 1. La retina, su ubicación (en el ojo humano).

La retina de mamíferos está constituida por seis tipos celulares principales, que se conectan a través de sinapsis: los fotorreceptores conos y bastones, las células bipolares (ON u OFF subdivididas en 3 a 5 subtipos cada una), horizontales (2 subtipos), amácrinas (29 subtipos), ganglionares (15 subtipos), y las células de Müller, el principal tipo de célula glial de la retina. En la mayoría de las especies de mamíferos, los bastones son aproximadamente 20 veces más numerosos que los conos, aunque la cantidad de ambos tipos celulares varía marcadamente sobre la superficie de la retina (revisado por Masland, 2001). En el centro de la retina humana y de primates (denominado *fóvea*), donde la agudeza visual es máxima, se observan sólo conos.

Los fotorreceptores se encuentran en la capa de la retina más cercana al fondo del globo ocular y más alejada de la córnea y de la entrada de luz (Figura 2). Por consiguiente, ésta debe atravesar las otras capas antes de alcanzar la capa de fotorreceptores, salvo en la *fóvea*, donde la luz incide directamente en los fotorreceptores.

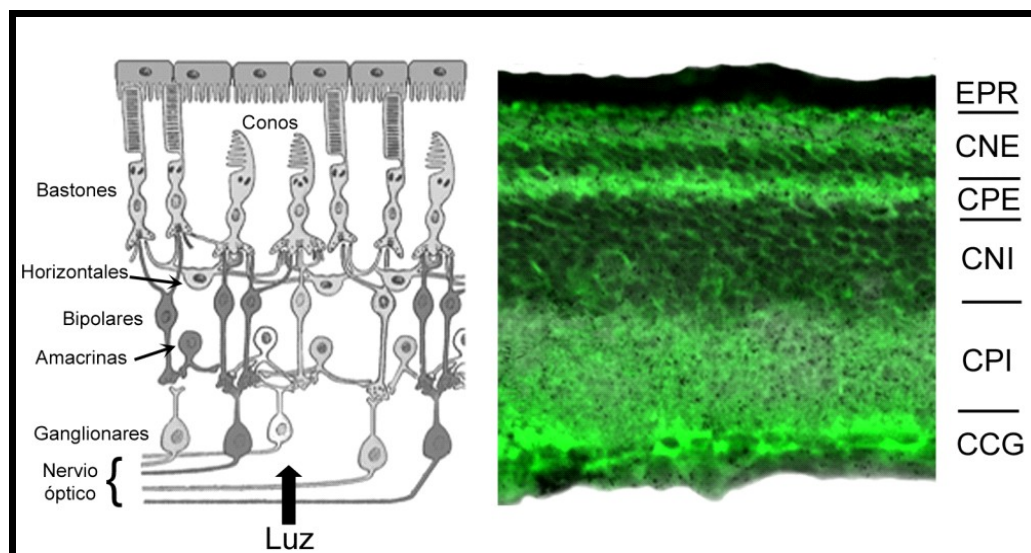


Figura 2. En el panel de la izquierda se representa un esquema de la retina donde se puede observar la distribución de los diferentes tipos celulares que la conforman. En el panel de la derecha se muestra una foto de microscopía confocal de un corte de retina de teñido con eosina donde se observa la típica distribución en capas de este tejido. EPR: epitelio pigmentario de la retina; CNE: capa nuclear externa; CPE: capa plexiforme externa; CNI: capa nuclear interna; CPI: capa plexiforme interna; CCG: capa de células ganglionares.

La posición de la retina, por lo tanto, se encuentra “invertida” respecto a la entrada de la luz. A través de esta disposición, los fotorreceptores se encuentran en contacto con una capa de células, el epitelio pigmentario (EPR), que contiene un pigmento negro llamado melanina que absorbe la luz que no es capturada por la retina, evitando que ésta se refleje en la parte posterior del ojo y vuelva a la retina, lo que degradaría la imagen visual. Desde el fondo hacia el centro del globo ocular, los distintos tipos celulares se disponen de la siguiente manera: los somas de los fotorreceptores se localizan en la capa nuclear externa (CNE), con los segmentos externos (lado apical) dirigidos hacia el EPR y los terminales sinápticos hacia el centro del globo ocular. Los terminales de los fotorreceptores hacen sinapsis con las prolongaciones de las células horizontales y bipolares en la capa plexiforme externa (CPE). Los somas de las células horizontales, bipolares y amácrinas se localizan en la parte media, denominada capa nuclear interna (CNI). Las células bipolares son más numerosas y dominan la capa media de la retina. Las sinapsis establecidas entre las proyecciones neuríticas de las células bipolares, amácrinas y ganglionares se localizan en la capa plexiforme interna (CPI). Por último, las células ganglionares se ubican en la capa retiniana más cercana al

centro del globo ocular formando la capa de células ganglionares (CCG), cuyos axones forman el nervio óptico, proyectan fuera del ojo a través del disco óptico. Las células bipolares reciben *input* directo de los fotorreceptores, y hacen sinapsis con las células ganglionares. Las células horizontales conectan a los fotorreceptores con las células bipolares; las células amácrinas establecen conexiones sinápticas, paralelas a la superficie retiniana, entre neuronas bipolares y ganglionares (Figura 2). En base a las conexiones anatómicas y funcionales entre los distintos tipos celulares retinianos, se postula que la información fluye a través de la retina siguiendo dos vías: un camino directo desde los fotorreceptores a las células bipolares y de éstas a las células ganglionares; y uno indirecto, en el que las células horizontales se interponen entre los fotorreceptores y las células bipolares, y las células amácrinas entre las células bipolares y las células ganglionares. La vía directa de transmisión de información es altamente específica; la vía indirecta, en cambio, es más difusa. Este plan general de conexiones retinianas, fundamentalmente a nivel de las vías directas, varía dramáticamente entre la *fóvea* y las zonas periféricas. En la *fóvea* o las zonas adyacentes, un fotorreceptor (cono) se conecta con una única célula bipolar y ésta a su vez con una única célula ganglionar. La ventaja de este sistema es la alta densidad de muestreo que permite una gran resolución espacial (revisado por Masland, 2001 y por Tessier-Lavigne, 2001).

1.a. MECANISMO DE FOTOTRANSDUCCION

La principal función diferenciada de la retina es el mecanismo de fototransducción. La visión se inicia con la transformación de paquetes de energía electromagnética en señales nerviosas susceptibles de ser interpretadas por el cerebro. Los ojos de los vertebrados poseen los dos tipos de fotorreceptores, bastones y conos. Los primeros intervienen en la visión con luz de baja intensidad (escotópica), ya que son capaces de responder a unos pocos fotones y pierden su capacidad de emitir señales al aumentar la intensidad luminosa ambiental debido a su rápida saturación. Los conos, en cambio, son activos durante la visión diurna de alta intensidad (fotópica). Los conos no son capaces de dar respuesta en luz tenue, por lo tanto, son menos sensibles que los bastones y

presentan umbrales elevados de saturación. La señal interpretada por los conos es más rica en detalles y permite la percepción del color.

Los bastones están formados por un segmento externo, donde se produce la absorción de la luz y un terminal sináptico, donde se produce la liberación de un neurotransmisor (glutamato), a través del cual la señal alcanza los otros tipos celulares (Figura 3). Entre el segmento externo y el terminal se encuentra el segmento interno, donde ocurren la mayoría de los procesos metabólicos. La organización estructural y funcional de los conos es esencialmente similar a la de los bastones. Los segmentos externos de ambos tipos de fotorreceptores poseen una extensión de membrana, formando una pila ordenada de discos de membrana, donde se encuentran altas concentraciones de un pigmento fotosensible, la rodopsina en el caso de los bastones y tres tipos distintos de conopsinas (en la retina humana) en las tres clases de conos que absorben máximamente a longitudes de onda cortas (azul), a longitudes medias (verde) y a longitudes largas (rojo).

el



Figura 3. Representación de un bastón retiniano. Se muestra el segmento externo, segmento interno y el terminal sináptico

Sorprendentemente, en oscuridad completa el fotorreceptor se encuentra despolarizado. Este fenómeno se debe a una elevada conductancia a iones Na^+ en el segmento externo que fluyen desde el espacio extracelular hacia el interior de la célula, originando lo que se denomina corriente oscura, una corriente despolarizante entrante. El circuito de corriente es completado por un flujo saliente de iones K^+ en el segmento interno y en el terminal. En presencia de luz, el fotorreceptor se

hiperpolariza, es decir, se incrementa la magnitud de la diferencia de potencial transmembrana debido al bloqueo del influjo de sodio. El potencial de membrana de un fotorreceptor en reposo (en completa oscuridad) es de aproximadamente -40 mV. Un pulso de luz provoca una hiperpolarización, cuya magnitud aumenta con la intensidad del estímulo. La respuesta máxima lleva el potencial transmembrana a un valor de -70 mV, cercano al potencial de equilibrio del potasio. En condiciones de oscuridad, se libera glutamato de manera tónica en el terminal sináptico del fotorreceptor. El cambio de potencial generado por la luz en el segmento externo, se propaga hacia el terminal, donde se traduce en la inhibición de la liberación del transmisor. A nivel postsináptico, el decremento de la liberación de glutamato provoca cambios en la conductancia de la membrana de las células bipolares y horizontales (Nicholls, 1992).

El pigmento visual de los bastones, la rodopsina, está compuesto por dos moléculas: una proteína llamada opsina y un cromóforo, el aldehído 11-cis de la vitamina A (retinal). La absorción de un fotón produce la isomerización del retinal que pasa a una configuración 11-trans. La proteína sufre rápidos cambios conformacionales con varios intermediarios. Uno de ellos, conocido como metarrodopsina II, es el estado activo del fopigmento. Una vez que la rodopsina fue estimulada, el 11-trans-retinal se separa de la opsina que ya no responde a la luz.

Mediante el uso de registros de *patch clamp* y de técnicas moleculares, se demostró que el compuesto guanosina monofosfato cíclico (GMPc) es el segundo mensajero involucrado en la transmisión de la señal luminosa, desde la membrana de los discos hasta el segmento externo de los bastones. En condiciones de oscuridad, el nucleótido mantiene canales catiónicos (de Na^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+}) abiertos en la membrana plasmática del segmento externo. El flujo de iones genera la corriente oscura, producida en un 80% por el influjo de Na^+ y en un 15 % por Ca^{2+} , a favor de sus gradientes electroquímicos (el 5% restante es debido al Mg^{2+}). Al incidir sobre el fotorreceptor, la luz provoca la caída de los niveles de GMPc, el consecuente cierre de los canales dependientes del nucleótido y la interrupción de la corriente oscura, que causa la hiperpolarización del fotorreceptor. Luego de la transformación de la rodopsina a su estado activo (la metarrodopsina II), se activa una

proteína G particular de los discos de los fotorreceptores, denominada transducina. Esta proteína se activa intercambiando GDP por GTP, y produce la activación de una fosfodiesterasa específica de GMPc, que cataliza la transformación de éste en 5'-guanosina monofosfato (5'-GMP). Consecuentemente, los niveles del nucleótido disminuyen, se cierran los canales catiónicos y el fotorreceptor se hiperpolariza. Esta secuencia de eventos permite una gran amplificación de la respuesta a la luz, la fotoactivación de una única molécula de rodopsina puede provocar la hidrólisis de 100.000 moléculas de GMPc por segundo (revisado por Tessier-Lavigne, 2001).

2. EL GABA EN LA RETINA

El ácido γ -aminobutírico (GABA), fue el primer compuesto que satisfizo todos los criterios para ser establecido como un neurotransmisor en la retina de vertebrados (Massey y Redburn, 1987; Dowling, 1987). El GABA desempeña un papel clave en el procesado de información visual en la retina, a través de elementos celulares laterales inhibitorios como las células horizontales y amácrinas, que modulan el flujo vertical de información visual desde los fotorreceptores hasta las células ganglionares. Las neuronas GABAérgicas representan aproximadamente la mitad de las neuronas inhibitorias y tres cuartas partes de las sinapsis inhibitorias de la retina de vertebrados. Un ejemplo de estos circuitos laterales inhibitorios son las células horizontales que interactúan con conos y células bipolares de una manera no completamente elucidada. Se ha demostrado que las células horizontales de algunos vertebrados son GABAérgicas. Este tipo celular se estudió más detalladamente en la retina de vertebrados inferiores como peces y reptiles (Wu, 1991). También se han obtenido evidencias que indican la presencia de inmunorreactividad para GABA y la enzima que cataliza su síntesis, la enzima glutamato descarboxilasa (GAD) en células horizontales de mamíferos (Osborne y col., 1986; Agardh y col., 1987; Grunert y Wässle, 1990).

Otro tipo de circuito modulador es el constituido por las células interplexiformes (un tipo particular de célula amácrina) (Dowling y Ehinger, 1978; Wulle y Schnitzer, 1989), que establecen circuitos de retroalimentación negativa sobre las dendritas de las células bipolares en la CPE (Pourcho y

Goebel, 1983). En mamíferos existen al menos dos tipos de células interplexiformes GABAérgicas (Nakamura y col., 1980; Wässle y Chun, 1989). Recientemente se ha descrito en retinas de ratas y ratones que el GABA participa en las sinapsis entre células interplexiformes (dopaminérgicas) y células AII (otro tipo de célula amácrina que distribuye la señal de los bastones al sistema de conos) (Contini y Raviola, 2003). En células amácrinas se ha demostrado la co-localización de GABA con otros neurotransmisores como acetilcolina, dopamina y posiblemente indolaminas (Kosaka y col., 1987; Wässle y Chun, 1988; Massey y col., 1991).

Se ha postulado que las células horizontales y amácrinas GABAérgicas constituyen los principales componentes de la periferia de los campos receptivos de las células bipolares y ganglionares retinianas. En la CPE, las células bipolares reciben *input* de las células horizontales y constituyen uno de los componentes de la periferia de los campos receptivos. Por otro lado, en la CPI, las células amácrinas GABAérgicas establecen sinapsis recíprocas con los terminales axónicos de las células bipolares, conexiones que podrían ser responsables de la modulación temporal de las señales que emergen de las células bipolares (Yang, 2004).

El GABA actúa a través de receptores de membrana específicos. Los receptores GABAérgicos se clasifican en tres grupos: 1) receptores GABA_A, 2) receptores GABA_B y 3) receptores GABA_C.

Los receptores GABA_A son complejos supramoleculares que conforman canales de Cl⁻ modulados por ligando, y están constituidos generalmente por 5 subunidades proteicas. Se han descrito 6 tipos de subunidades α (α_1 – α_6), 3 tipos de subunidades β (β_1 – β_3), 3 tipos de subunidades γ (γ_1 – γ_3), un tipo de subunidad δ , 1 tipo de subunidad ϵ y un tipo de subunidad π . La combinación más frecuente del complejo incluye dos subunidades α , dos γ y una β ($\alpha_2\beta\gamma_2$) o dos α , dos β y una γ ($\alpha_2\beta_2\gamma$). Estos tipos de subunidades se expresan diferencialmente en distintas zonas del SNC. La composición del complejo supramolecular determina las propiedades funcionales y farmacológicas del receptor GABA_A (Mehta y Ticku 1999). En particular en el hámster dorado se ha descrito la presencia de las subunidades α_1 y α_5 , así como β_1 y β_3 (Naum y col., 2001). La respuesta

GABAérgica de tipo A es reproducida por muscimol e isoguvacina y es antagonizada por bicuculina, gabazina (SR 95531) y (+)- β -hidrastina, entre otros, y es susceptible de modulación por una variedad de ligandos, como benzodiazepinas, barbitúricos, etanol y neuroesteroides.

Los receptores GABA_B son proteínas transmembrana acopladas a proteínas G y a un sistema de segundos mensajeros que regulan canales de Ca²⁺ y/o K⁺. Estos receptores son activados por baclofen, ácido (\pm)-4-amino-3(5-cloro-2-tienil)butanoico y ácido 3-aminopropil-(metil)fosfínico (SKF 97541) y son inhibidos por faclofen, saclofen y 2-hidroxisaclofen (revisado por Mehta y Ticku 1999; Bormann, 2000).

Los receptores GABA_C son complejos moleculares que, como los receptores GABA_A, conforman un canal de Cl⁻ modulado por ligando pero son homómeros o heterómeros de la subunidad ρ , de la cual se han descrito tres variedades (ρ 1– ρ 3). Estos canales, como los receptores de tipo GABA_A, son sensibles al bloqueo por picrotoxina, pero son insensibles tanto a bicuculina como a baclofen.

Los agonistas específicos de los receptores GABA_C son el ácido *cis*-4-aminocrotónico (CACA) y el ácido carboxílico *cis*-2-aminometil-cicloproprano (CAMP) en tanto que el ácido 1,2,5,6-tetrahidropiridina-4-metilfosfónico (TPMPA) es un antagonista específico. Los receptores GABA_C son insensibles a benzodiazepinas, barbitúricos y neuroesteroides (revisado por Bormann, 2000).

A partir de estudios inmunohistoquímicos, de hibridización *in situ*, electrofisiológicos y farmacológicos, se han obtenido evidencias que sugieren la presencia de receptores de tipo GABA_A y GABA_C en las terminales de los conos en retinas de gatos y ratones (Yang, 2004). Aunque se han propuesto otros mecanismos independientes de GABA para mediar el *feedback* negativo entre los conos y las células horizontales (Kamermans y Spekreijse, 1999; Kamermans y col., 2001), el GABA podría estar involucrado en la modulación de la información dado que este transmisor se libera desde las células horizontales y podría activar receptores específicos en los terminales de los conos. Adicionalmente, se ha descrito la presencia de receptores GABA_A y GABA_C en células horizontales de la retina de diversas especies de vertebrados, incluyendo algunas especies de

mamíferos. Múltiples evidencias demuestran la presencia de receptores de GABA_A y GABA_C en dendritas y terminales axónicos de las células bipolares de conejos, ratas, monos y humanos. También se ha observado expresión de receptores de GABA_A en células amácrinas y ganglionares, tanto en retina de mamíferos como de no mamíferos, mientras que la presencia de receptores GABA_C en estas últimas células es controversial (revisado por Yang, 2004).

2.a. BIOSÍNTESIS Y METABOLISMO DE GABA

El GABA es sintetizado a partir de L-glutamato en una única reacción catalizada por la enzima glutamato descarboxilasa (GAD) que requiere fosfato de piridoxal como cofactor. Estudios de fraccionamiento subcelular han demostrado que los sinaptosomas están altamente enriquecidos en esta enzima, lo que indica que la síntesis de GABA ocurre principalmente en el terminal axónico más que en el soma. Se ha descrito la presencia de dos isoformas de GAD (denominadas GAD-65 y GAD-67) en la retina de diversas especies (Johnson y Vardi, 1998; Andrade da Costa y Hokoc, 2003).

Figura 4. Biosíntesis y metabolismo del GABA.

El catabolismo del GABA comienza con la enzima GABA-transaminasa (GABA-T) que cataliza la transferencia del grupo amino del GABA al α -cetoglutarato regenerando glutamato, su precursor (“GABA *shunt*”). La GABA-T es una enzima mitocondrial que se localiza tanto en neuronas GABAérgicas como en células gliales (revisado por Kalloniatis y col., 1999). Los niveles de GABA pueden ser alterados por diferentes drogas. En particular en este trabajo se utilizó el ácido 3-mercaptopropiónico que interfiere con el fosfato de piridoxal e inhibe la actividad de GAD y la vigabatrina (VGB) que inhibe irreversiblemente la actividad de GABA-T, aumentando los niveles de GABA.

2.b. MECANISMO DE LIBERACIÓN Y RECAPTACION DE GABA

El conjunto de evidencias disponibles indica que la liberación de GABA en retinas de vertebrados es un mecanismo altamente dependiente de la especie. En términos generales, este proceso involucra dos mecanismos diferentes: uno dependiente de Ca^{2+} extracelular y otro independiente de este catión, que involucra la reversión del transportador de GABA de alta afinidad (Schwartz, 1987). El primer mecanismo ocurre a través de la entrada de Ca^{2+} extracelular en respuesta a una señal despolarizante (como altas concentraciones extracelulares de potasio o la presencia de glutamato) que induce la exocitosis de vesículas que contienen GABA. Una cantidad considerable de trabajos avalan que la liberación de GABA es dependiente de Ca^{2+} extracelular en retinas de diferentes especies de mamíferos (Neal y col., 1992). En el segundo mecanismo, la direccionalidad del transportador de GABA depende del gradiente del neurotransmisor y del potencial de membrana. Generalmente la concentración intracelular de GABA es alta y la concentración extracelular es baja, por lo tanto frente a un estímulo despolarizante, el transportador podría liberar GABA hacia el espacio sináptico. Una vez que la célula se hiperpolariza, el transportador vuelve a recaptar el GABA liberado. Este tipo de liberación carece de especialización anatómica y se caracteriza porque requiere Na^+ , no depende de Ca^{2+} , la dependencia del voltaje coincide con la del transportador del neurotransmisor y, además, los transportadores tienen una farmacología característica (revisado por Schwartz, 2002). Se ha descrito este mecanismo en células horizontales de retinas de sapos y teleósteos (Schwartz, 1982; Ayoub y Lam, 1984), y en retinas de pollo (Hofman y Möckel, 1991; Duarte y col., 1993). Además, se ha demostrado que la liberación de GABA en células amácrinas de conejo no es vesicular (Jönsson y col., 1986; O'Malley y Masland, 1989). Asimismo, se ha demostrado que células amácrinas de primates, estimuladas por glutamato o ácido kaínico liberan GABA a través de su transportador (Andrade da Costa y col., 2000). El mecanismo de liberación de GABA en la retina de hámster no ha sido previamente caracterizado, y su estudio constituye uno de los objetivos del presente trabajo de Tesis.

En la mayoría de las sinapsis del sistema nervioso que involucran neurotransmisores aminoacídicos,

la terminación de la señal ocurre por la recaptación rápida del neurotransmisor liberado al espacio sináptico. Este proceso involucra la actividad de transportadores específicos de alta afinidad en el terminal sináptico o en las células gliales cercanas. Los transportadores de GABA son proteínas con 12 dominios transmembrana, que co-transportan Na^+ y Cl^- a favor de gradiente (Nelson, 1998). En la retina de rata se han identificado tres transportadores de GABA, GAT-1, GAT-2 y GAT-3, en células GABAérgicas amácrinas e interplexiformes, y en células de Müller (Johnson y col., 1996). Recientemente se ha demostrado que los transportadores GAT-1 y GAT-3 participan en la liberación de GABA independiente de Ca^{2+} en el cerebelo (Rossi y col., 2003) y que el transportador GAT-1 media este proceso en las fibras musgosas del hipocampo de rata (Vivar y Gutierrez, 2005).

3. LA MELATONINA EN LA RETINA DE VERTEBRADOS

La melatonina, originalmente identificada por Lerner y col. en 1959, fue considerada durante mucho tiempo de origen exclusivamente pineal (Axelrod, 1974). Sin embargo, múltiples pruebas experimentales demuestran en forma concluyente la biosíntesis de melatonina y la presencia de las enzimas involucradas en la retina de rata, ratón, conejo, cobayo, oveja, vaca, mono y humanos, y en diversos vertebrados no mamíferos (revisado por Tosini, 2000). En nuestro laboratorio se demostró por primera vez, que la retina de hámster es un sitio de síntesis activa de melatonina, independiente de la actividad pineal (Faillace y col., 1994; 1995). La ablación pineal no afecta el contenido de melatonina retiniana (Reppert y Sagar, 1983) y no se observaron cambios en la actividad de una de las enzimas que participa de la síntesis de melatonina retiniana, la enzima serotonina N-acetiltransferasa (NAT), luego de la pinealectomía (Hamm y Menaker, 1980) aunque en retinas de rata y hámsteres pinealectomizados, los niveles retinianos de melatonina aumentan significativamente en estas condiciones (Yu y col., 1981; Reiter y col., 1983; Faillace y col., 1995). En conjunto, estas evidencias establecen que la retina de una gran variedad de vertebrados posee los mecanismos necesarios para sintetizar y secretar melatonina al espacio extracelular retiniano, regulando sus niveles *in situ* (Tosini, 2000).

Una cantidad considerable de indicios sugieren que los fotorreceptores son el sitio más probable para la síntesis de melatonina retiniana (revisado por Tosini, 2000). Sin embargo, se ha demostrado que la biosíntesis de melatonina retiniana persiste en una cepa de ratones cuyos fotorreceptores degeneran totalmente durante el desarrollo postnatal (Tosini y Menaker 1998). En forma reciente, en nuestro laboratorio se han obtenido evidencias que sugieren que en la retina de pollo, las células ganglionares también tienen la capacidad de sintetizar este metoxiindol, aun en condiciones aisladas (Garbarino Pico y col., 2004).

3.a. BIOSÍNTESIS Y METABOLISMO DE LA MELATONINA

Las reacciones involucradas en la biosíntesis de melatonina se describen en la Figura 5. La biosíntesis de melatonina, tanto en la glándula pineal como en la retina, comienza con la captación de triptofano circulante que es convertido en 5-hidroxitriptofano, en una reacción catalizada por la enzima triptofano-hidroxilasa. El 5-hidroxitriptofano a su vez, es transformado en serotonina (5-HT) por acción de una descarboxilasa de aminoácidos aromáticos (AAAD). La 5-HT es convertida en melatonina, a través de dos reacciones catalizadas enzimáticamente. En una primera etapa, la serotonina es acetilada a N-acetilserotonina por la acción de la enzima arilalquilamina N-acetiltransferasa (AANAT, también denominada serotonina N-acetiltransferasa, NAT). Subsecuentemente, la N-acetilserotonina es O-metilada por la hidroxindol-O-metiltransferasa (HIOMT), que cataliza la transferencia del grupo metilo de la S-adenosilmetionina a la posición 5-hidroxi, dando melatonina como producto final. Existen sólidas evidencias que sugieren que el AMPc es el segundo mensajero clave en la biosíntesis de melatonina, tanto en la glándula pineal como en la retina (Zawilska y Nowak, 1992). Una gran cantidad de trabajos avalan firmemente la participación de este nucleótido en la regulación de los niveles de melatonina y en el control de la transcripción, la actividad y la vida media de la NAT (Klein y col., 1997; Iuvone y col., 1999; Ivanova e Iuvone, 2003).

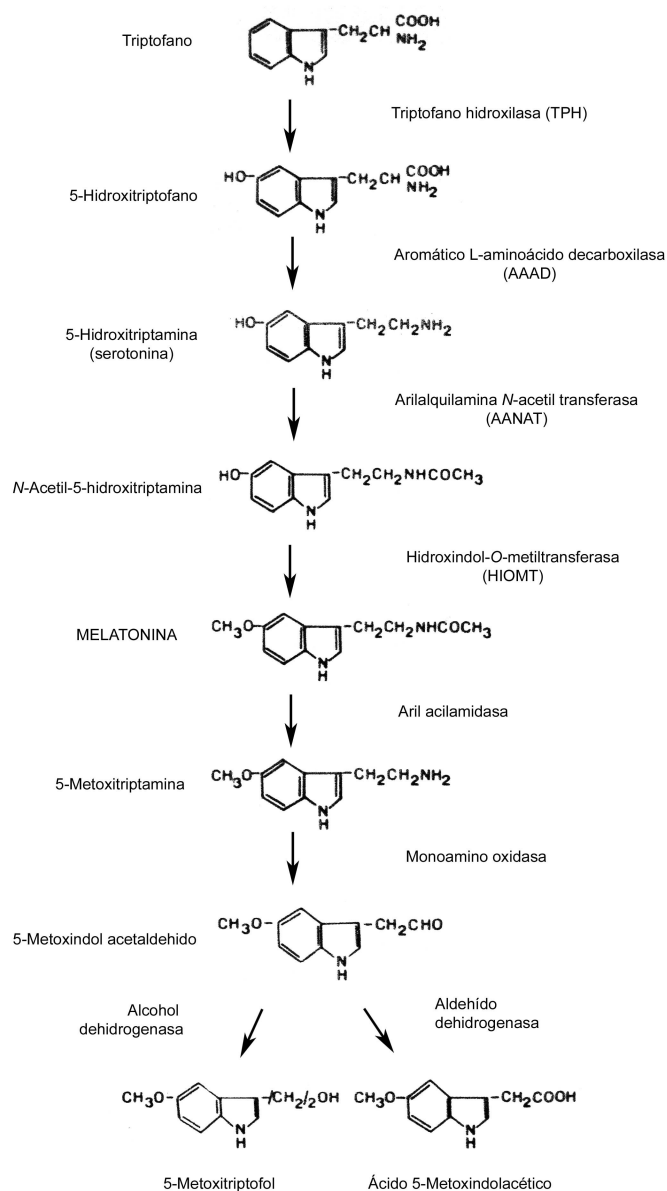


Figura 5. Biosíntesis y metabolismo de la melatonina.

En mamíferos, el 84% de la melatonina circulante es metabolizada periféricamente en el hígado, a través de hidroxilación para dar 6-hidroximelatonina, que es conjugada y excretada en la orina o en las heces. El 1% de la melatonina permanece inalterada y el 15% se transforma en un metabolito no indólico, la N-acetil-5-metoxiquinurenamina. En la retina de *Xenopus*, reptiles y aves, aunque no en mamíferos, se ha demostrado que la melatonina se desacetila a 5-metoxitriptamina a nivel local siguiendo el camino descrito en la Figura 5 (Cahill y Besharse, 1989; Grace y col., 1991; Li y col., 1997).

3.b. REGULACION DE SÍNTESIS DE MELATONINA RETINIANA

Una de las características más salientes de la biosíntesis de melatonina, tanto en la glándula pineal como en la retina de la mayoría de las especies estudiadas, es la dramática ritmicidad día-noche en su biosíntesis, que provoca aumentos nocturnos en los niveles de este metoxiindol. Varios autores describieron variaciones diarias en el contenido de melatonina con valores máximos durante la etapa de oscuridad en la retina de diversas especies de aves y mamíferos (Bubenick y col., 1978; Pang y col., 1980; Hamm y Menaker, 1980; Grota y col., 1982, Faillace y col., 1994).

Los resultados sobre la ritmicidad de la NAT en oscuridad constante se obtuvieron en experimentos *in vivo* en los que no puede descartarse la influencia de un mecanismo de control desde el sistema nervioso central. Sin embargo, en experimentos *in vitro*, se observó que la síntesis y liberación de N-acetilserotonina y melatonina son directamente reguladas por la iluminación ambiental, siendo incrementadas por la oscuridad y reducidas por la luz (Yu y col., 1982, Redburn y Mitchell, 1989, Faillace y col., 1995). Adicionalmente, se observaron cambios en la actividad de NAT en retinas de rana *in vitro* en respuesta a la luz y a la oscuridad (Iuvone y Besharse, 1983).

La regulación de la biosíntesis de melatonina ha sido extensivamente estudiada en la retina de *Xenopus*, que al igual que en la retina de mamíferos, es sensible a la luz y la oscuridad. Sin embargo, se ha demostrado que un oscilador circadiano endógeno en la retina de esta especie regula paralelamente este proceso (Cahill y col., 1991). Asimismo, se ha demostrado que la biosíntesis de melatonina en la retina del hámster es regulada por un oscilador circadiano local, con un aumento durante la noche (Tosini y Menaker, 1996) y persiste durante al menos 5 días en retinas aisladas expuestas a oscuridad constante.

Diversas evidencias señalan a la dopamina retiniana como una señal trascendente en la regulación de la biosíntesis de melatonina (Iuvone, 1986). En este sentido, se describió un efecto inhibitorio de la dopamina sobre la actividad de NAT en retina de rana, rata y conejo (Iuvone y Besharse, 1986; Nowak y col., 1989). Los antagonistas dopaminérgicos revierten el efecto inhibitorio de la luz sobre

la actividad de NAT. En la retina de hámster hemos demostrado que la dopamina es un mediador del efecto inhibitorio de la luz sobre la síntesis de melatonina (Jaliffa y col., 2000). El *turnover* retiniano de este neurotransmisor es mayor de día que de noche, y durante el día subjetivo es más alto que durante la noche subjetiva (Jaliffa y col., 2000).

Paralelamente al bien establecido rol inhibitorio de la dopamina sobre la síntesis de melatonina, algunas evidencias sugieren la participación del sistema GABAérgico en el control de este proceso biosintético. La picrotoxina inhibe el incremento de la actividad de NAT inducido por la oscuridad en ojos de *Xenopus*, en tanto que agonistas GABAérgicos la aumentan durante la fase de luz (Boatright y Iuvone, 1989 a, b). Se ha sugerido que el efecto GABAérgico podría estar mediado por la inhibición de la liberación de dopamina, a través de receptores específicos localizados en las células amácrinas o interplexiformes dopaminérgicas (Kamp y Morgan, 1980). El incremento en la actividad de NAT inducido por muscimol es inhibido por la administración de agonistas dopaminérgicos. Los efectos del muscimol y los antagonistas dopaminérgicos no son aditivos. Asimismo, la disminución de la actividad de NAT por antagonistas GABAérgicos en oscuridad es revertida por la aplicación de un antagonista dopaminérgico (Kazula y col., 1993). Al presente, no se dispone de antecedentes sobre el papel del GABA en la producción de melatonina en la retina de hámster y el estudio de este aspecto forma parte de los objetivos de este trabajo de Tesis.

3.c. FUNCIONES DE LA MELATONINA

En la retina la melatonina podría actuar como un neuromodulador parácrino local que regula la fisiología de este tejido (Besharse y col., 1988; Tosini, 2000). En este sentido se ha demostrado que la melatonina inhibe la liberación de dopamina y acetilcolina de las células amácrinas (Dubocovich, 1983; Mitchell y Redburn, 1991), estimula la liberación de glutamato (Faillace y col., 1996a), inhibe la acumulación de AMPc (Faillace y col., 1994) y estimula la síntesis de GMPc en la retina del hámster dorado (Faillace y col., 1996b). Se ha postulado que la melatonina podría modular su propia síntesis a través de un *feedback* negativo (Faillace y col., 1995). Asimismo, el metoxiindol

activa el *shedding* y la fagocitosis de los discos de los segmentos externos de los fotorreceptores (Besharse y Dunis, 1983), promueve los movimientos fotomecánicos de adaptación a la oscuridad en fotorreceptores y el epitelio pigmentario de la retina de distintas especies (Pierce y Besharse, 1987) y modula la sensibilidad visual (Mc Googan y Cassone, 1999).

Se ha demostrado la presencia de receptores de melatonina en la retina de diversas especies, incluyendo el hámster dorado (Dubocovich y Takahashi, 1987; Reppert y col., 1995, Rosenstein y Dubocovich, 2001). La melatonina activa distintos tipos de receptores de membrana: MT1 y MT2 en mamíferos o Mel_{1a}, Mel_{1b} y Mel_{1c} en no mamíferos. En la retina de *Xenopus* se demostró la presencia de receptores Mel_{1a} en la CPI y Mel_{1c} en la CPI, la CNE y en la CCG (Wiechmann, 2003).

En la retina humana se ha descrito una alta densidad de receptores MT1 en fotorreceptores y células ganglionares (Meyer y col., 2002). Otros autores han demostrado la presencia de este mismo receptor también en células horizontales y células amácrinas AII, tanto en monos como en humanos. Este resultado es la primera evidencia que apoya la hipótesis de que la melatonina, a través de las células amácrinas AII, participa en la adaptación a la luz (Scher y col., 2003). Por otra parte, se ha observado que la melatonina disminuye la onda c del electroretinograma (ERG) (Textorius y Nilsson, 1987) y puede afectar el potencial de membrana del epitelio pigmentario de retina de pollo directamente o a través de células retinianas o de la coroides (Nao-i y col., 1989). Además, se ha demostrado que la melatonina incrementa la amplitud de las ondas a y b del ERG en larvas de *Xenopus* transgénicas que sobreexpresan el receptor Mel_{1c} (Wiechmann y col., 2003). Por otro lado, tanto la dopamina como la melatonina podrían participar en la generación del ritmo circadiano de la onda b del ERG en la iguana (Miranda-Anaya y col., 2002).

Evidencias relativamente recientes sugieren que la melatonina, siendo una molécula altamente lipofílica, podría participar en funciones pleiotrópicas, no mediadas por receptor. En este contexto, diversas evidencias experimentales han llevado a postular que la melatonina puede actuar como antioxidante, protegiendo del daño celular causado por radicales libres (Reiter, 1995; Reiter y col., 1997). En particular en la retina, se ha demostrado que la melatonina protege contra la peroxidación

lipídica inducida óxido nítrico (NO) (Siu y col., 1999), y previene el daño oxidativo retiniano inducido por isquemia/reperfusión (Celebi y col., 2002). En nuestro laboratorio se ha demostrado por métodos computacionales, la factibilidad termodinámica de la reacción de melatonina con el radical OH•, uno de los radicales libres más deletéreos de los sistemas biológicos (Turjanski y col., 1998). La melatonina es también capaz de reaccionar en forma directa con NO para dar al menos un producto estable que fue caracterizado por RMN y Rayos X (Turjanski y col., 2000). Asimismo, se demostró que la melatonina es un potente inhibidor del sistema nitrérgico retiniano, dado que a concentraciones fisiológicas inhibe tanto el influjo de L-arginina (sustrato en la síntesis de NO), como la actividad de la óxido nítrico sintasa (NOS) y el efecto de la L-arginina (Sáenz y col., 2002). De hecho, se ha demostrado que la melatonina inhibe la expresión de la isoforma inducible de la NOS y protege contra el daño oxidativo en modelos experimentales en los que el NO es causa de destrucción molecular (Cuzzocrea y col., 1997). En forma reciente, nuestro grupo ha demostrado que la melatonina aumenta el *uptake* de glutamato y la actividad de glutamina sintetasa e inhibe la actividad de glutaminasa en la retina del hámster (Sáenz y col., 2004).

4. RITMOS Y RELOJES CIRCADIANOS

Los seres vivos tenemos la capacidad de adaptarnos a cambios cíclicos del medio ambiente (la alternancia día-noche, variaciones estacionales de la temperatura, etc.) generando respuestas adaptativas que involucran al sistema endócrino y reproductivo, la conducta, el ciclo sueño/vigilia, la temperatura corporal, la alimentación, etc. Estas respuestas adaptativas son reguladas por relojes endógenos capaces de ajustar nuestra fisiología en forma anticipatoria a los cambios del medio externo. Las variaciones cíclicas endógenas constituyen los ritmos biológicos: cambios metabólicos, fisiológicos, bioquímicos y conductuales de origen endógeno y autosostenido que se producen cíclicamente, con una periodicidad definida.

El componente principal del sistema circadiano son los núcleos supraquiasmáticos (NSQ), un grupo de neuronas localizadas en la zona ventromedial del hipotálamo (Figura 6).

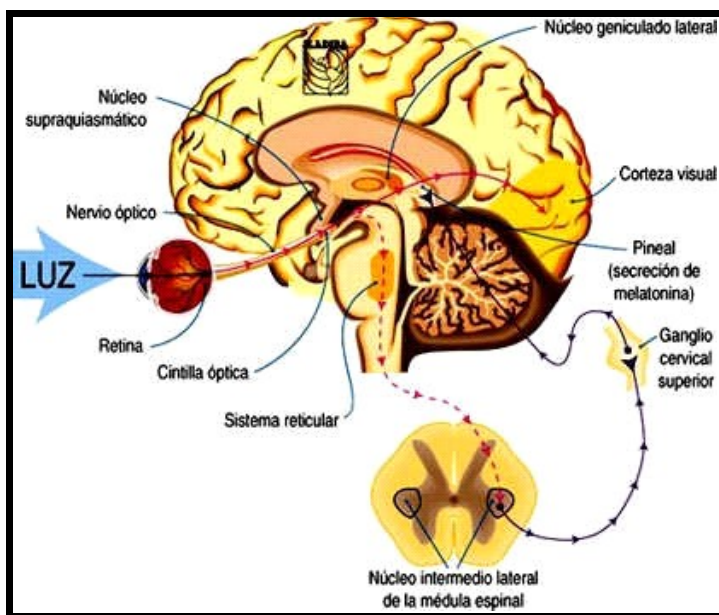


Figura 6. A) Organización del sistema circadiano en mamíferos. B) Esquema del sistema circadiano.

Los NSQ poseen actividad rítmica endógena con un período cercano a 24 h y son capaces de organizar temporalmente la fisiología y el comportamiento del organismo. La organización del sistema circadiano involucra diversas estructuras relacionadas a través de un conjunto complejo de comunicaciones neuronales y está constituido por tres componentes principales: i) la retina y sus proyecciones específicas a los NSQ y al núcleo intergeniculado talámico; ii) los NSQ y sus proyecciones al hipotálamo, tálamo y cerebro basal-anterior; y iii) el núcleo intergeniculado y sus proyecciones a los NSQ (Moore, 1993) (Figura 6).

Los ritmos biológicos mejor caracterizados son aquellos que presentan una periodicidad próxima a las 24 horas y se denominan circadianos (del latín *circa* y *dies*: cerca de 24 horas). Estos ritmos circadianos son generados en los NSQ y son sincronizados por los ciclos diarios de luz-oscuridad a través de fotorreceptores especializados. En mamíferos, los NSQ poseen el papel de “marcapasos maestro” en el control de un amplio espectro de ritmos conductuales y fisiológicos: locomoción, sueño/vigilia, termorregulación, función cardiovascular, y procesos endócrinos, entre otros (Cassone y col., 1993). Los osciladores endógenos expresan ritmos aun en un medio ambiente constante (condiciones de “libre curso”), con una frecuencia endógena cercana a las 24 horas. En presencia de señales periódicas exógenas (sincronizador o “Zeitgeber”), generalmente el ciclo de luz-oscuridad, los ritmos circadianos se sincronizan exactamente a 24 horas.

Cuando la luz (el principal agente sincronizador) incide en la retina, provoca un conjunto de cambios bioquímicos que son procesados localmente y que salen de la retina a través del tracto retinohipotalámico hacia los NSQ. De esta forma, la secuencia de luz-oscuridad detectada por la retina produce la sincronización de la oscilación interna a la hora local, ajustando la actividad de los NSQ (“dándole cuerda al reloj”) a una periodicidad de 24 h exactas.

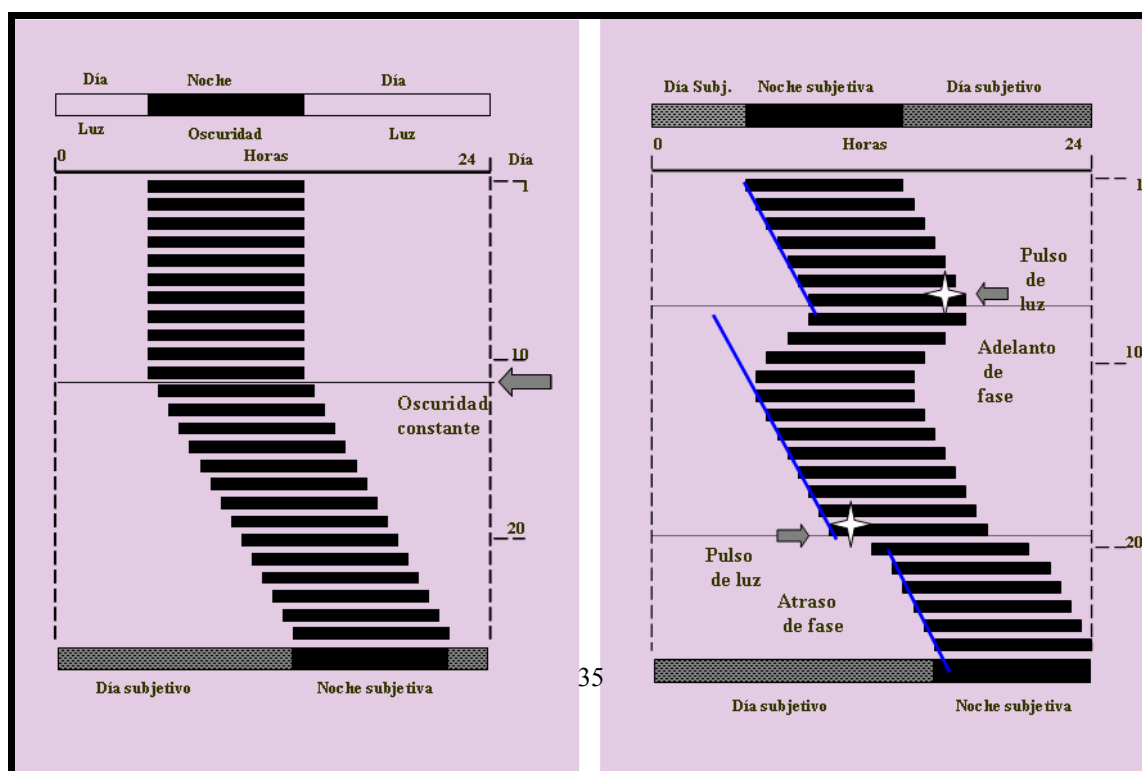
Para que una variación diaria sea considerada un ritmo circadiano debe ser generada endógenamente (Aschoff, 1960; Pittendrigh, 1960, 1993). Esta característica la diferencia de

aquellas variables biológicas que oscilan diariamente también, pero que sólo acompañan a cambios en factores ambientales (como la luz y la temperatura). Para diferenciar un ritmo circadiano de estas oscilaciones diarias es imprescindible demostrar que las variaciones rítmicas del parámetro en estudio persisten en condiciones ambientales constantes. En caso contrario, se asume que este parámetro está regulado por un factor exógeno.

4.a. MECANISMO DE SINCRONIZACIÓN

En condiciones constantes, un organismo mantiene sus ritmos según la hora que marca su reloj endógeno. En los animales nocturnos, el *día subjetivo* corresponde a su fase de reposo y la *noche subjetiva* a su fase de actividad. La sincronización puede ser inducida por una gran variedad de estímulos que atrasan o adelantan el reloj, dependiendo del momento en que se los aplique. Para examinar cómo un estímulo es capaz de afectar y sincronizar al reloj, el individuo debe estar expuesto a condiciones constantes (*free-running*).

Una curva de respuesta de fase (PRC del inglés, *phase response curve*) es una representación de la dinámica del comportamiento de un oscilador sometido a un pulso de estimulación administrado en diferentes horas del día, es decir que muestra los factores ambientales (tales como la iluminación o la temperatura) que tienen efectos relevantes sobre la expresión de los ritmos endógenos y que son capaces de producir ajustes (sincronizaciones) a través de mecanismos biológicos específicos y dentro de límites bien definidos para cada especie. En ella se representa la fase de exposición a un pulso de luz con respecto al tamaño y dirección del cambio de fase. La duración total del ciclo determina el “horario circadiano” (o *circadian time*, CT); se define CT 12 como el comienzo de la noche subjetiva. Una hora de tiempo circadiano equivale al período en oscuridad constante / 24



(horas). En la Figura 7 se muestra un actograma teórico en el que se representa la actividad locomotora de un hámster tanto en condiciones de luz-oscuridad como en condiciones de oscuridad constante. En este último caso se muestra cómo responde el animal a pulsos de luz.

Figura 7. Actogramas teóricos en los que se representa la actividad locomotora de un hámster. En el panel de la izquierda se muestra la diferencia de la actividad locomotora de hámster en un ciclo de luz-oscuridad con respecto a la misma actividad en condiciones de oscuridad constante (*free running*). En el panel de la izquierda se representa el efecto de un pulso de luz sobre la actividad locomotora de un hámster mantenido en condiciones de oscuridad constante.

Un pulso de luz al comienzo de la noche subjetiva produce un retraso en el comienzo de la actividad en los días sucesivos, en tanto que un pulso de luz al final de la noche subjetiva produce un adelanto de la actividad en los días siguientes (Figura 7). A estos cambios se los denomina cambio de fase de actividad locomotora, que constituye un buen indicador de la actividad del reloj central.

En la Figura 8 se representa la PRC fótica para el hámster, en la que la variable medida es el cambio de fase de actividad locomotora y el estímulo es un pulso de luz. En esta otra forma de representación se observa que los pulsos aplicados durante el comienzo de la noche subjetiva causan retrasos de fase y que los pulsos aplicados al final de la noche subjetiva producen adelantos de fase (Marques y col., 1997).

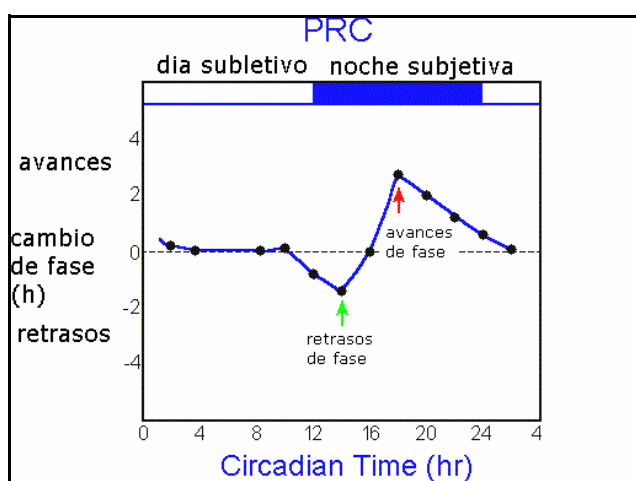


Figura 8. Curva de respuesta de fase fótica para hámsteres mantenidos en oscuridad constante. El estímulo utilizado es un pulso de luz.

4.b. LA RETINA COMO RELOJ CIRCADIANO AUTÓNOMO

Si bien la mayoría de los ritmos biológicos son efectivamente regulados por los NSQ, se han descrito una serie de osciladores “periféricos” aparentemente independientes del reloj central (Balsalobre y col., 2000, Reppert y col., 2002). Entre éstos merece particular atención la

demostración experimental de que la retina de diversas especies contiene un reloj local (Tosini y Fukuhuda, 2002), dado el papel central de esta estructura en la organización del sistema circadiano. La intensidad luminosa a mediodía de un día soleado difiere en hasta doce órdenes de magnitud respecto a la medianoche. La capacidad del sistema visual para medir contrastes sobre un *background* que cambia en este rango de intensidades, es el resultado de un conjunto complejo de mecanismos bioquímicos y neurofisiológicos. Muchos de estos cambios ocurren agudamente en respuesta a la iluminación ambiental; sin embargo se ha demostrado que algunas respuestas adaptativas retinianas son reguladas por osciladores circadianos endógenos. Estos relojes inducen cambios en el sistema visual en función de la hora del día, tomando ventaja de la predictibilidad de los cambios diarios en el ambiente fótico. Midiendo el tiempo más que la intensidad luminosa, un reloj puede inducir respuestas adaptativas con anticipación a los cambios en la iluminación ambiental que ocurren al atardecer o al anochecer. De hecho, diversas funciones oculares (Tabla I) varían circadianamente, en algunos casos aun en condiciones de iluminación constante y aun luego de la lesión de los NSQ o la transección del nervio óptico (para una revisión ver Cahill y Besharse, 1995; Tosini y Fukuhara, 2002).

Tabla I. Ritmos diarios en la retina.

<i>Ritmo</i>	<i>Fase del pico</i>	<i>Especie</i>
Sensibilidad visual	oscuridad	rata, humanos
<i>Shedding</i> de discos externos de fotorreceptores	luz	rata, hámster
onda b del ERG	oscuridad	conejo
Biosíntesis de melatonina	oscuridad	rata, ratón, hámster
Actividad de AA-NAT	oscuridad	rata
Biosíntesis de dopamina	luz	rata, ratón, hámster.
Niveles de AMPc	oscuridad	hámster
Niveles de los mensajeros de <i>Aa-nat</i> , <i>TrpH</i> , <i>Hiomt</i>	oscuridad	rata
pH (<i>in vitro</i>)	oscuridad	conejo
Síntesis de conoopsinas	oscuridad	ratón
Síntesis de rodopsina	luz	ratón

La primera demostración experimental respecto a la existencia de un reloj retiniano autónomo se obtuvo en el *Xenopus* (Besharse y Iuvone, 1983). Varios años más tarde se demostró la presencia de un reloj circadiano en la retina de hámster, con la capacidad de regular la síntesis circadiana de

melatonina en oscuridad constante (Tosini y Menaker, 1996). En forma posterior, estos resultados se extendieron a otros mamíferos como la rata y el ratón (Tosini y col., 1998). El hámster mutante *tau*, cuyo período de oscilación circadiana es significativamente más corto que el de animales normales (como resultado de una mutación en la caseína quinasa I ϵ (Lowrey y col., 2000)), presenta también un período corto en cuanto a la secreción retiniana de melatonina (Tosini y Menaker, 1996) y en cuanto al ritmo de fagocitosis de los discos del segmento externo de los fotorreceptores (Grace y col., 1996). Este resultado constituye una evidencia sólida en favor de que el oscilador retiniano exhibe mecanismos moleculares similares a los del reloj central. Como ya se mencionara, la retina es una estructura relativamente compleja formada por diferentes tipos de células especializadas. Dado que los ritmos retinianos en diversas especies se han asociado estrechamente con la capacidad de sintetizar melatonina y teniendo en cuenta el conjunto de evidencias que señalan a los fotorreceptores como el sitio más probable para este proceso biosintético, el conjunto de evidencias previas ha llevado a postular fuertemente a este tipo celular como el sustrato anatómico más probable para la localización del reloj local. Sin embargo, en forma reciente se ha demostrado que las células ganglionares de la retina de pollo tienen la capacidad de sintetizar melatonina, aun en condiciones aisladas, con máximos en la fase de luz, contrariamente a lo que ocurre en los fotorreceptores (Garbarino-Pico y col., 2004). Asimismo, se ha demostrado la expresión de un nuevo fotopigmento (distinto a los pigmentos visuales clásicos), la melanopsina, exclusivamente en células ganglionares y se ha postulado que las células que expresan esta proteína podrían ser las que proyectan a los NSQ (Berson y col., 2002). Este conjunto de evidencias parece indicar que las células ganglionares podrían tener la capacidad de oscilar en forma autónoma y responder a la luz en forma independiente de los fotorreceptores.

Muy recientemente se han obtenido evidencias acerca de una posible interacción entre los NSQ y la retina a través de la demostración de que el rango de variación del período del ritmo de actividad locomotora es significativamente mayor en hámsteres con enucleación bilateral que en animales control (Yamazaki y col., 2002).

Si bien el mecanismo del procesamiento de la información luminosa involucrado en la formación de la imagen consciente ha sido exhaustivamente examinado, la información disponible respecto a fenómenos fisiológicos intrínsecos a la generación de ritmos biológicos locales, e incluso sobre los tipos celulares retinianos directamente involucrados, es aún incompleta. En todo caso, la información retiniana ambiental en mamíferos es crítica para la sincronización y los cambios de fase de los ritmos circadianos generados por el marcapasos hipotalámico. Por lo tanto, el estudio de la actividad rítmica retiniana, ya sea auto-sostenida o como eferencia de la información procedente de los NSQ es esencial para la comprensión de la génesis y la fisiología de la actividad circadiana.

5. NEUROESTEROIDES EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

El término neuroesteroide (NE) fue acuñado en 1981 por Etienne Baulieu y Paul Robel para referir a diversos metabolitos de hormonas esteroideas presentes en el cerebro en concentraciones independientes de sus niveles plasmáticos. Se han denominado neuroactivos a aquellos esteroides que independientemente de su origen, actúan en el tejido neural (Majewska y col., 1986; Schumacher 1990; Robel y Baulieu, 1994). Se ha demostrado que el cerebro de mamíferos contiene cantidades sustanciales (en algunos casos, superiores a las circulantes) de precursores de esteroides, de colesterol y de sus derivados sulfatos y lipídicos, cuya acumulación parece ser al menos parcialmente independiente de su producción por glándulas esteroideogénicas periféricas. Recién en las dos últimas décadas se ha demostrado en forma concluyente que el cerebro puede también sintetizar esteroides *de novo*. En este sentido, se ha demostrado la síntesis de pregnenolona en cultivos primarios de células gliales (Hu y col., 1987), así como la capacidad de homogenatos de ciertas regiones cerebrales y de cultivos de células gliales y neuronales de convertir pregnenolona en progesterona *in vitro* (Weidenfeld y col., 1980). En cerebro de rata, principalmente en la corteza cerebral, la amígdala y el hipocampo se ha detectado la enzima mitocondrial que cataliza la escisión de la cadena lateral del colesterol, el citocromo P450 *side chain cleavage* (P450_{scc}) (Le Goascogne y col., 1987). El sulfato de colesterol es también sustrato del mecanismo de clivaje de la cadena

lateral dando sulfato de pregnenolona que a su vez, puede ser hidrolizado a esteroides primarios por acción de sulfatasas presentes en el sistema nervioso central (Iwamori, 1976). Se ha demostrado que el cerebro contiene enzimas metabolizantes de esteroides clásicos que dan origen a una amplia variedad de compuestos neuroactivos. Los principales metabolitos centrales de la progesterona incluyen la 5α -dihidroprogesterona y la $3\alpha, 5\alpha$ -tetrahidroprogesterona. Se representa a continuación las vías metabólicas de biosíntesis de NEs en el sistema nervioso central (Figura 9).

Figura 9. Biosíntesis de neuroesteroides

5.a. MECANISMO DE ACCIÓN DE NEUROESTEROIDES

Múltiples pruebas experimentales demuestran que los NEs modulan la excitabilidad neuronal y producen efectos conductuales significativos en el rango de minutos, luego de su administración sistémica. Los efectos anestésicos, sedantes, hipnóticos y anticonvulsivantes se han asociado a la interacción de NEs con receptores ionotrópicos a través de modulaciones alostéricas positivas o negativas que afectan la eficacia de diversos sistemas de neurotransmisores, fundamentalmente el GABA (Baulieu, 1998; Rupprecht y Holsboer, 1999; Lambert y col., 2003).

Las primeras evidencias en este sentido surgieron hace unos 50 años, tras la observación de los efectos anestésicos y anticonvulsivantes de los esteroides (Seyle, 1941, 1942). Desde entonces, diversos autores han demostrado que los esteroides inducen cambios en la actividad neuronal que ocurren con una latencia de segundos a pocos minutos (Godeau y col., 1978; Schumacher, 1990), regulando directamente la actividad del receptor $GABA_A$. En este sentido, por métodos electrofisiológicos se demostró la potenciación por alfaxalona de la corriente de Cl^- inducida por GABA (Harrison y col., 1984; Turner y col., 1989), y se observó que el colesterol, modula el *binding* de GABA al receptor $GABA_A$ (Majewska y col., 1985). Existen esteroides excitatorios e inhibitorios que, respectivamente, excitan o inhiben la actividad de los receptores $GABA_A$. Los esteroides activos sobre el receptor $GABA_A$ mejor caracterizados son los metabolitos naturales de la

progesterona y de la desoxicorticosterona: la alopregnanolona y la 5 α -tetrahydrodesoxicorticosterona (5 α -THDOC), respectivamente. Estos esteroides 3 α -hidroxilados con un anillo reducido, son los ligandos más potentes del complejo supramolecular que constituye el receptor GABA_A, con valores de DE50 en el rango de 10 y 50 nM en presencia de GABA. Las principales hormonas esteroideas circulantes, 17 β -estradiol, progesterona, testosterona, y corticosterona o cortisol, en concentraciones fisiológicas, no modulan la actividad del receptor GABA_A directamente aunque algunas acciones a corto plazo de la progesterona probablemente se deban a la acción de esteroides activos derivados del metabolismo de la hormona sobre el receptor GABA_A (Orchinik y col., 1993). Las acciones modulatorias de los esteroides que activan al receptor GABA_A son similares a los efectos anestésicos de los barbitúricos: 1) aumento del *binding* del GABA (o de agonistas) y de benzodiazepinas a membranas cerebrales (Peters y col., 1988; Majewska, 1988; Turner y col., 1998), 2) inhibición del *binding* de [³⁵S]-terbutilciclofosforotionato (TBPS) al canal de Cl⁻ acoplado al complejo del receptor GABA_A de manera no competitiva (Majewska y col., 1986; Gee y col., 1988; Turner y col., 1989); 3) aumento del transporte de Cl⁻ inducido por GABA (Majewska y col., 1986; Turner y col., 1989, Im y col., 1990), y 4) potenciación de la corriente mediada por el receptor GABA_A en neuronas (Harrison y col., 1987, Peters y col., 1988, Majewska y col., 1988). Se ha demostrado que los efectos de los barbitúricos y de los neuroesteroides sobre la potenciación del *binding* de [³H]-muscimol y [³H]-flunitrazepam en sinaptosomas son aditivos o sinérgicos (Peters y col., 1988; Turnery col., 1989; Im y col., 1990). Análogamente, se demostró una acción aditiva de los esteroides y barbitúricos sobre la corriente de Cl⁻ (Peters y col., 1988), así como un efecto diferencial sobre la cinética de disociación del TBPS (Gee y col., 1988). Contrariamente a la alopregnanolona, a la THDOC, o a la androsterona (Guinjoan y col., 1992), que actúan como moduladores positivos, algunos NEs se comportan como moduladores inhibitorios del receptor GABA_A. La pregnenolona sulfato (PS) y la dehidroepiandrosterona sulfato (DHEAS) pertenecen a esta última categoría (Majewska y col.,

1987; Majewska y col., 1988; Mienville y col., 1989; Orchinik y col., 1993). La PS modifica en forma bimodal el *binding* de muscimol a membranas sinaptosomales, aumentando la unión a concentraciones nanomolares y disminuyéndola a concentraciones micromolares (Majewska y col., 1985). Ensayos funcionales subsecuentes demostraron que la PS actúa como modulador negativo del receptor GABA_A, ya que bloquea la corriente de Cl⁻ inducida por GABA en forma dependiente de la dosis (CI₅₀ = 60 mM) (Majewska y col., 1988; Majewska y Schwartz, 1987). Posteriormente se demostró que el neuroesteroide DHEAS también inhibe la corriente inducida por GABA de manera no competitiva (CI₅₀ = 10mM) (Majewska y col., 1990). Aunque tanto la DHEAS como la PS inhiben las corrientes inducidas por GABA, ambos esteroides difieren en su modo, y presumiblemente también, en su sitio de acción. Mientras que la PS es un potente inhibidor del *binding* de TBPS, la DHEAS es inefectiva (Majewska y Schwartz, 1987; Majewska y col., 1990). Además la DHEAS, a diferencia de la PS, disminuye el *binding* de benzodiazepinas a concentraciones micromolares (Demirgoren y col., 1991). La propiedad observada *in vitro* de la PS, y la DHEAS de actuar como moduladores inhibitorios del receptor GABA_A es consistente con sus acciones excitatorias observadas *in vivo* (Carette y col., 1984) y con sus efectos proconvulsivantes (Kokarte y col., 1999).

En comparación con los bien caracterizados efectos de los NEs sobre la postsinapsis GABAérgica, las evidencias a favor de efectos a nivel presináptico son escasas. Si bien se ha demostrado que la administración conjunta de estradiol y progesterona aumenta la liberación de GABA inducida por glutamato en el área preóptica, este efecto parece estar mediado por mecanismos genómicos (Fleischmann y col., 1992). En contraste, estudios electrofisiológicos sugieren que la alopregnanolona potencia la presinapsis GABAérgica (Poisbeau y col., 1997). Además, se ha demostrado que la PS modula la neurotransmisión mediada por glutamato en diferentes regiones del sistema nervioso (Wu y col., 1991; Mukai y col., 2002).

Además del efecto sobre la postsinapsis GABAérgica, se ha demostrado que la PS antagoniza las corrientes del cloruro activadas por glicina (Wu y col., 1990), estimula la corriente desencadenada

por N-metil-D-aspartato (NMDA) (Wu y col., 1991; Bowlby, 1993) y el aumento intracelular de Ca^{2+} mediado por el receptor de NMDA en cultivos de neuronas cerebrales (Irwin y col., 1992). Por otra parte, la PS aumenta la tasa de disparo de neuronas del área preóptica (Carette y Poulain, 1984). Más recientemente, se demostró que la PS incrementa la liberación de glutamato desde el terminal presináptico a través del aumento en niveles intracelulares de Ca^{2+} (Meyer y col., 2002). Además, en experimentos de microdiálisis *in vivo* se ha demostrado que la PS aumenta la liberación basal de acetilcolina en hipocampo y corteza de rata (Mayo y col., 2003) y que también aumenta la liberación basal de dopamina en el núcleo accumbens de rata (Barrot y col., 1999).

Hace 10 años se demostró la capacidad neuroesteroidogénica de la retina de rata. En este sentido, se identificó la presencia de $3\alpha,5\alpha$ -tetrahydrodesoxicorticosterona, 3α -hidroxi- 5α -dihidroprogesterona, 17-hidroxiprogesterona, y 17-hidroxipregnenolona junto con sus formas esterificadas en este tejido (Guarnieri y col., 1994). Este mismo grupo demostró la presencia de citocromo P450_{scc} en la capa de células ganglionares (Guarnieri y col., 1994). Otros autores demostraron inmunorreactividad para la enzima 3β -hidroxiesteroide-deshidrogenasa Δ^5 - Δ^4 -isomerasa en la retina de peces (Sakamoto y col., 2001). Más allá de estas evidencias, la capacidad esteroidogénica retiniana, no ha sido confirmada en ninguna otra especie de mamíferos.

6. DISFUNCIONES VISUALES

6.a. DISFUNCIONES VISUALES ASOCIADAS AL USO DE LA DROGA ANTIEPILEPTICA VIGABATRINA

El término epilepsia refiere a una clase de desordenes neurológicos frecuentes caracterizados por crisis convulsivas o no convulsivas recurrentes. Las manifestaciones de las crisis epilépticas son el resultado directo o indirecto de una alteración de la excitabilidad de neuronas únicas o de un grupo de neuronas. Las convulsiones pueden clasificarse desde el punto de vista clínico en dos grandes grupos: parciales y generalizadas (primarias). Estos dos tipos de crisis tienen diferentes sustratos anátomo-fisiológicos. Las crisis parciales se originan en un pequeño grupo de neuronas que

constituyen un foco epileptogénico, que desencadena una excitabilidad potenciada. Por lo tanto, los síntomas dependen de la localización cerebral del foco. Las crisis parciales pueden ser parciales simples (sin alteración de la conciencia) o parciales complejas (con alteración de la conciencia). Si una crisis parcial continúa, el paciente puede perder la conciencia y sufrir una crisis generalizada (extender rígidamente las extremidades (fase tónica) y después sacudir todas las extremidades (fase clónica)). Estos síntomas se clasifican como crisis parcial compleja tonico-clónica secundariamente generalizada. Las crisis generalizadas (primarias) evolucionan a partir de circuitos tálamo-corticales. Estas crisis trastornan simultáneamente la actividad de ambos hemisferios cerebrales desde el comienzo. Las crisis epilépticas generalizadas y las epilepsias asociadas con ellas son heterogéneas en cuanto a sus manifestaciones y a las causas subyacentes. Esta clasificación, aunque simple, ha sido de considerable utilidad para los neurólogos, dado que la eficacia de los anticonvulsivantes depende del tipo de crisis epiléptica (revisado por Westbrook, 2001). No es sorprendente que los fármacos que bloquean la excitación o facilitan la inhibición sean anticonvulsivantes eficaces. Las benzodiazepinas diazepam y lorazepam facilitan la inhibición mediada por receptores GABA_A y son el tratamiento habitual de urgencia en las crisis epilépticas repetitivas. Los anticonvulsivantes de uso frecuente como el valproato de Na⁺, la etosuximida, la trimetadiona, la primidona, la fenitoína y la carbamazepina (CBZ), causan una inhibición de canales de Na⁺ o Ca²⁺ dependientes de voltaje (revisado por Westbrook, 2001).

Hacia principios de la década del 90⁷ se introdujeron nuevos fármacos para la terapéutica de la epilepsia. Uno de estos compuestos fue la VGB (Sabril®) que inhibe irreversiblemente la actividad de la GABA-T, aumentando los niveles de GABA. La VGB resultó una droga antiepiléptica altamente efectiva para el tratamiento de crisis parciales, particularmente en casos de resistencia a otros fármacos y en particular en el síndrome de West. Originalmente, se consideró que la VGB era una droga bien tolerada. Sin embargo, en 1997 Eke y colaboradores describieron una constricción periférica del campo visual en tres pacientes tratados con VGB, que persistió aún después de la interrupción del tratamiento. A partir de este trabajo pionero, en los últimos años se ha

incrementado el número de estudios de las funciones visuales en pacientes epilépticos tratados con VGB. La VGB es actualmente usada en alrededor de 60 países, en varios de los cuales como Inglaterra (Harding y col., 1998), Finlandia (Kalviainen y col., 1999), Suiza (Toggweiler y Wieser, 2001) y España (Mauri-Llerda, 2000) se han estudiado los efectos visuales de este fármaco. Sin embargo la prevalencia de esta disfunción es todavía controversial. Este estudio no se ha realizado con anterioridad en nuestro país. En colaboración con el Centro Municipal de Epilepsia del Hospital Ramos Mejía se analizará en el marco de esta Tesis, el efecto de la VGB sobre las funciones visuales en una población de pacientes epilépticos.

6.b. EL GLAUCOMA

El glaucoma de ángulo abierto, una de las principales causas de ceguera irreversible en los países desarrollados, es una disfunción ocular de alta prevalencia caracterizada por una pérdida progresiva de las funciones visuales que se correlaciona con la muerte de células ganglionares retinianas y con una atrofia de la cabeza del nervio óptico. En la Argentina, el glaucoma afecta aproximadamente a un millón de personas. El más frecuente de todos los glaucomas, el glaucoma crónico de ángulo abierto, se produce por el deterioro progresivo del sistema de eliminación del humor acuoso, que se agrava hasta perder la capacidad de mantener un valor normal de presión intraocular (PIO). Al presente, la terapia del glaucoma puede optar por un tratamiento farmacológico o quirúrgico, dependiendo del tipo de glaucoma y del grado de avance de la enfermedad. El tratamiento farmacológico clásico consiste en colirios hipotensores oculares que se aplican una o varias veces al día y se deben mantener indefinidamente. Estos colirios pueden producir reacciones adversas, locales o generales, que en muchos casos requieren la interrupción inmediata del tratamiento. El tratamiento quirúrgico puede optar entre dos modalidades: el tratamiento con láser o la intervención quirúrgica propiamente dicha. El primero consiste en la aplicación de láser en la zona obstruida que impide el flujo del humor acuoso y permite mejorar su filtrado, disminuyendo así la PIO. Sin embargo, las posibilidades del tratamiento con láser son limitadas, es poco eficaz en jóvenes y es

insuficiente en los casos graves. La técnica denominada trabeculectomía es útil en los pacientes intolerantes a la medicación y consiste en la creación de una nueva vía de salida del humor acuoso, que se aplica en pacientes que no logran mantener la PIO dentro de los límites normales, aún con tratamiento farmacológico. A pesar de esta variedad de estrategias disponibles, aún existe controversia en la terapia médica del glaucoma. Una complejidad adicional de esta enfermedad es que su curso es prácticamente asintomático hasta etapas avanzadas e irreversibles de pérdida visual. Por lo tanto, dado que el diagnóstico es generalmente tardío, el máximo logro alcanzable hasta el presente es detener la progresión de la enfermedad, pero en ningún caso se ha logrado una recuperación visual significativa. De hecho, a pesar de la disminución farmacológica o quirúrgica de la PIO, en muchos casos se ha observado que el déficit visual persiste o progresa significativamente.

Desde hace ya varias décadas, la comunidad científica internacional ha reconocido la importancia de disponer de modelos animales para el estudio de la patología humana. La similitud de un proceso patológico en animales de experimentación, aún con diferencias respecto al humano, constituye una herramienta de valor indiscutible para la comprensión de un proceso en su contraparte humana. A pesar de múltiples intentos, la búsqueda de modelos animales para el estudio del glaucoma ha sido hasta ahora relativamente poco fructífera, lo que ha limitado seriamente la investigación en este área.

El conjunto de evidencias anátomo-fisiológicas indica que el sitio primario de resistencia al flujo acuoso reside en la red trabecular, la porción profunda de la red corneoescleral y la membrana basal yuxtacanalicular cercana al canal de Schlemm. En este sentido, las evidencias indican que la matriz extracelular del trabeculado, constituida esencialmente por glicosaminoglicanos (GAGs), contribuye significativamente como barrera de filtración al pasaje de humor acuoso. Se ha demostrado por métodos inmunohistoquímicos que el contenido de mucopolisacáridos trabeculares aumenta significativamente en el glaucoma cortisónico experimental (François y col., 1984). Se ha descrito que la hipertensión ocular en ratas de laboratorio inducida por la administración de

esclerosantes suaves se correlaciona con una deposición anormal de componentes de la matriz extracelular a nivel de la cabeza del nervio óptico en forma análoga a lo observado en ojos glaucomatosos humanos y de primates no humanos (Morrison y col., 1998). El ácido hialurónico (AH) es el GAG más abundante en el trabeculado humano (Accot y col., 1985) y se ha demostrado que la hialuronidasa exógena disminuye significativamente la resistencia al flujo acuoso (Knepper y col., 1984). En trabajos previos hemos demostrado que un hipotensor ocular de uso frecuente, la brimonidina, aumenta significativamente la actividad de hialuronidasa trabecular (Benozzi y col., 2000), la enzima que degrada AH. A partir de estos resultados, hemos postulado que el efecto hipotensor de la brimonidina podría estar mediado, al menos en parte, por la estimulación de esta actividad enzimática, es decir, por el aumento en el *clearance* de GAGs trabeculares. Si una disminución en el contenido de GAGs disminuye la PIO, parece posible que el aumento en el contenido de AH en la cámara anterior induzca el efecto opuesto. Sobre la base de esta hipótesis, en el marco de esta Tesis, se analizará el efecto de la administración crónica (1 vez/semana) de AH en la cámara anterior del ojo.

Aunque el incremento de la PIO es, probablemente, el principal factor de riesgo en el glaucoma primario de ángulo abierto, se ha sugerido que algunos factores adicionales como la isquemia (Cioffi, 2001), la excitotoxicidad inducida por glutamato (Vorwerk y col., 1999), la privación de factores de crecimiento (Quigley y col., 1999) o el daño oxidativo (Vorwerk y col., 1999; Osborne y col., 1999) pueden contribuir significativamente al progreso de la patología y se ha postulado que su desarrollo involucra la muerte apoptótica de hasta el 50% de las células ganglionares (García-Valenzuela y col., 1995; Dkhissi y col., 1999; Tatton, 1999).

La retina es una estructura altamente susceptible al daño oxidativo, debido a su alto consumo de oxígeno, su alta proporción de ácidos grasos poliinsaturados y su exposición directa a la luz visible. En este contexto, se ha sugerido que el daño oxidativo podría constituir un factor causal en el daño glaucomatoso (Kuryshva y col., 1996). En trabajos recientes de nuestro laboratorio hemos analizado la actividad del sistema de defensa antioxidante retiniano en ratas con hipertensión ocular

crónica inducida por AH. Los resultados obtenidos indican un déficit significativo en la capacidad antioxidante retiniana en este modelo experimental. La actividad de catalasa disminuyó a partir de la 3^{era} semana de hipertensión ocular y esta disminución se mantuvo disminuida a lo largo de todo el tratamiento (10 semanas). La disminución en la actividad de superóxido dismutasa (SOD) se observó a partir de la 6^{ta} semana de tratamiento con AH. Si bien los mecanismos involucrados en los cambios en la actividad de estas enzimas son aún elusivos, es altamente probable que la falta de correlación entre estas actividades enzimáticas, provoque un desbalance en el sistema de defensa antioxidante (Moreno y col., 2004). Esta hipótesis es avalada por el incremento en la peroxidación lipídica retiniana, que no cambió a las 3 semanas pero aumentó significativamente a las 6 y 10 semanas de hipertensión ocular. Asimismo, los niveles retinianos de melatonina (un compuesto con probadas propiedades antioxidantes a nivel local (Reiter y col., 2004)) disminuyeron significativamente en todos los períodos estudiados. Por primera vez, estos resultados demuestran un déficit significativo en la actividad del sistema de defensa antioxidante endógeno en retinas con hipertensión ocular (Moreno y col., 2004). Teniendo en cuenta las evidencias a favor del efecto antioxidante de la melatonina, es posible que la caída en los niveles de este metoxiindol pudiera contribuir a la disminución de la capacidad retiniana en la defensa contra el daño causado por la acumulación de radicales libres.

Diversas líneas experimentales avalan la participación del glutamato en la neuropatía glaucomatosa. Aunque el glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio retiniano, su administración en concentraciones suprafisiológicas resulta tóxica, específicamente para las células ganglionares (Vorwerk y col., 1999; Quigley, 1999). Dado que este tipo celular es el *target* intrarretiniano específico de la hipertensión ocular, esta evidencia se ha considerado un aval (aunque indirecto) en favor la excitotoxicidad glutamatérgica en el glaucoma. Asimismo, varios autores demostraron un aumento significativo en las concentraciones vítreas de glutamato en el glaucoma humano y experimental (Dreyer y col., 1996; Tatton, 1999). En contraste, otros grupos no encontraron cambios similares en monos o ratas con glaucoma (Levkovitch-Verbin y col., 2002; Carter-Dawson

y col., 2002). Si bien la concentración vítrea de glutamato no constituye un índice fiable del contenido sináptico del neurotransmisor y por lo tanto esta controversia no excluye formalmente la hipótesis de la excitotoxicidad, la participación del glutamato como factor causal en el glaucoma es objeto de activa controversia. En trabajos recientes de nuestro laboratorio, se han obtenido evidencias que constituyen la primera demostración experimental de cambios significativos en el reciclado retiniano de glutamato en ojos con hipertensión ocular. En este sentido, a las 3 semanas de tratamiento con AH se observa una disminución en el influjo de glutamato y en la actividad de glutamina sintetasa, así como un aumento en la liberación y el transporte de glutamina y en la actividad de glutaminasa retiniana. Estos cambios podrían contribuir en forma sinérgica y/o redundante a un aumento significativo en las concentraciones sinápticas del neurotransmisor (Moreno y col., 2005). Hasta el presente no se dispone de ningún estudio que analice la actividad GABAérgica en modelos experimentales de glaucoma. Por lo tanto, como parte del trabajo de Tesis se examinará este aspecto en animales con hipertensión ocular.

Objetivos

Sobre la base de estas consideraciones generales, los objetivos del presente trabajo de Tesis fueron:

Examinar el mecanismo de liberación y la localización del GABA en la retina de hámster dorado.

Estudiar el efecto del GABA sobre el contenido de melatonina en la retina de hámster.

Examinar la actividad circadiana del sistema GABAérgico retiniano en el hámster.

Estudiar la participación del GABA en la interacción entre la retina y los NSQ.

Examinar la modulación del sistema GABAérgico retiniano por melatonina.

Examinar el efecto de los neuroesteroides sobre la actividad del sistema GABAérgico retiniano.

Estudiar las funciones visuales en una población de pacientes epilépticos tratados con vigabatrina, una droga que aumenta los niveles de GABA.

Analizar el efecto de la administración crónica de vigabatrina sobre las funciones visuales en el hámster.

Desarrollar un modelo de glaucoma experimental en ratas a través de inyecciones intracamerales crónicas de ácido hialurónico y examinar la actividad GABAérgica en esas condiciones.

Materiales y métodos

1. Animales y Pacientes

1.1. Hámsteres

Se utilizaron hámsteres dorados (*Mesocricetus auratus*) (120 - 150 g), mantenidos bajo un fotoperíodo de 14 h de luz - 10 h de oscuridad (encendido de luces a las 06.00 h), con libre acceso a alimento y bebida. Los animales se sacrificaron por decapitación, se enuclearon los ojos, se extrajeron las retinas y se procesaron en forma inmediata, o se mantuvieron a -20° C, o entre 0 - 4° C, según el protocolo experimental. Los experimentos que se llevaron a cabo en condiciones de libre curso (*free running*), se realizaron luego de exponer los hámsteres a oscuridad constante durante 2 días. Dado que el período circadiano promedio de los animales de nuestra colonia es de aproximadamente 24,1 h, luego de 48 h de oscuridad constante se espera que los tiempos circadianos (*circadian time*, CT) se desfasen entre 6 y 12 min como máximo. Por lo tanto, se asumió que los CT fueron aproximadamente iguales a los horarios dados por el ciclo de luz-oscuridad (*Zeitgeber time*, ZT) al que los animales estuvieron expuestos previamente. El sacrificio de los animales, la extracción de las retinas, las incubaciones y/o ensayos enzimáticos en las retinas de animales mantenidos en condiciones de oscuridad, se realizaron bajo luz roja tenue.

1.2. Ratas

Para los estudios del sistema GABAérgico en animales con hipertensión ocular crónica, se utilizaron ratas *Wistar* macho (150 - 200 g) mantenidas en condiciones similares a las descriptas para los hámsteres, aunque en este caso el fotoperíodo fue de 12 h de luz - 12 h de oscuridad con encendido de las luces a las 07.00 h. Los animales se sacrificaron a las 12.00 h por decapitación, se enuclearon los ojos, se extrajeron las retinas y se procesaron como se describe en cada caso.

En todos los procedimientos que involucraron animales se siguieron estrictamente los Estatutos para el Uso de Animales en Oftalmología e Investigación Visual de la *Association for Research in Vision and Ophthalmology* (ARVO).

1.3. Pacientes

Se reclutaron pacientes con diagnóstico de epilepsia en el Centro Municipal de Epilepsia del Hospital “Ramos Mejía”, Buenos Aires, Argentina, bajo la supervisión de la Dra. Silvia Kochen. Un total de 20 pacientes tratados con VGB y 15 tratados con CBZ que nunca fueron tratados con VGB, manifestaron por escrito su consentimiento para participar de este estudio.

2. Manipulaciones *in vivo*

2.1. Inyecciones intravítreas (i.v.)

Se utilizó una aguja 30 G montada en una jeringa Hamilton de 10 μ l. En animales anestesiados, se enfocaron los ojos bajo un microscopio binocular Colden con luz coaxial y se aplicaron las inyecciones en el borde de la esclera, en la cámara vítrea del ojo. La aguja se introdujo a través de la *pars plana* en un ángulo tal que no se dañara ni la retina ni el cristalino. Se inyectó un volumen de 2 μ l en un intervalo de 30 s. Se utilizó anestesia tópica (hidrocloruro de proparacaína al 0,5%) antes de realizar las inyecciones. Para estimar la concentración final de la droga se consideró un volumen total del vítreo de $20 \pm 2\mu$ l. En los experimentos en que los animales se mantuvieron en condiciones de oscuridad, las inyecciones se realizaron bajo luz roja tenue. Se excluyeron los animales que desarrollaron cataratas como resultado de la inyección.

2.2. Inyecciones en la cámara anterior

Las ratas se anestesiaron con una inyección intraperitoneal de hidrocloruro de ketamina (50mg/kg), e hidrocloruro de xilazina (0,5 mg/kg). Mediante una aguja de 30 G montada en una jeringa de tuberculina, se inyectaron 25 μ l de AH (10 mg/ml, en solución salina) en un ojo, y en el ojo contralateral, el mismo volumen de vehículo. Los ojos se enfocaron bajo un microscopio quirúrgico Colden con luz coaxial y la aguja se introdujo a través del limbo corneoescleral hacia la cámara anterior con el bisel hacia abajo. Cuando la punta del bisel alcanzó la cámara anterior, el líquido progresivamente incrementó la profundidad de la cámara, separando la aguja del iris y evitando el contacto con el cristalino. Las inyecciones se realizaron semanalmente y se cambió el sitio de la

inyección para evitar la formación de *pannus*. Se aplicó anestesia en forma tópica (hidrocloruro de proparacaína al 0,5%) antes de realizar las inyecciones. Se excluyeron los animales que desarrollaron cataratas o *pthisis bulbi*, cuya incidencia no superó el 5% del total de animales utilizados. Además, casi todos los animales desarrollaron un edema corneal localizado en el sitio de la inyección que no duró más de 24 h. No se observaron diferencias en la incidencia de estas complicaciones oculares entre los ojos inyectados con salina o con AH.

2.3. Determinación de la PIO

La PIO se determinó mediante un TonoPen XL (Mentor, Norwell, MA) en ratas conscientes según la técnica descrita por Moore y col. (1995). Los animales se envolvieron suavemente con una toalla, sin provocar estasis venosa ni efectos valsalva. Mientras un operador lo mantenía firme, otro realizaba la determinación. Se obtuvieron cinco lecturas de cada ojo cuya variación resultó menor al 10%. Los promedios de estas lecturas se registraron como la PIO de un ojo y un día determinados. La PIO de cada animal fue promediada con el resto de los animales del mismo grupo y el valor promedio resultante fue utilizado para registrar la PIO media del grupo \pm error estándar (ES). En animales intactos no se observaron diferencias significativas entre el ojo derecho y el ojo izquierdo. Las mediciones de la PIO se hicieron a la misma hora cada día o semana (entre las 11.00 h y las 12.00 h), para evitar las variaciones diarias en este parámetro.

2.4. Registro de actividad locomotora

Para el registro de la actividad locomotora, los hámsteres se alojaron individualmente en jaulas de vidrio equipadas con una rueda de 14 cm de diámetro. Luego del registro durante 10 días bajo un ciclo de luz-oscuridad (L-O) de 14-10 h, los animales se mantuvieron en condiciones constantes de iluminación roja difusa (menor a 1 lux). La actividad se monitoreó utilizando el sistema Dataquest III® (Minimitter Co., Inc.) y la información se almacenó en una computadora para su posterior análisis. Los datos se recolectaron en forma continua con una frecuencia de muestreo de 5 minutos.

Los resultados se graficaron en un actograma, en el que las líneas consecutivas representan los días y en cada línea se muestra la actividad en forma de cuentas (o giros de rueda) por unidad de tiempo. El inicio de la actividad en rueda se consideró como la hora circadiana 12 (CT 12) y los corrimientos de fase del inicio del ciclo circadiano se definieron con respecto a este valor. Los pulsos de luz administrados a CT 18 producen el máximo adelanto en la fase de los ritmos circadianos de actividad locomotora de hámsteres mantenidos en oscuridad constante. El cambio de fase se calculó como la diferencia entre la fase del ritmo de actividad del día del tratamiento y la fase estable alcanzada 6 días después, expresada en minutos. Los adelantos de fase en los ritmos de los animales bajo condiciones de oscuridad constante se calcularon utilizando rectas que atravesaban los puntos de comienzo de actividad antes y después del tratamiento. El adelanto de fase se midió como la diferencia (en min) entre ambas rectas extrapoladas al día del pulso de luz (Pittendrigh, 1965).

Para determinar el efecto de la VGB en la respuesta del sistema circadiano a la luz, los animales se expusieron a oscuridad constante por aproximadamente 10 días antes del tratamiento. El día del experimento se los anestesió a CT 17 y se administró una inyección intravítrea de solución salina o VGB. A CT 18 se aplicó un pulso de luz de 10 minutos (50 lux) y los animales se mantuvieron en oscuridad constante durante 10 días más. Luego, se repitió el mismo procedimiento pero se aplicó el tratamiento contrario. Es decir, en un grupo de animales se aplicó primero vehículo y después de 10 días VGB y en otro se aplicó primero VGB y luego vehículo.

3. Determinación de parámetros GABAérgicos

3.1. Determinación de la liberación dinámica de [³H]-GABA

Las retinas se incubaron en forma individual en buffer HEPES-Tris (conteniendo 140 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 2,5 mM de CaCl₂, 1 mM de MgCl₂, 10 mM de HEPES y 10 mM de glucosa; ajustado a pH 7,4 con Tris-base) y [³H]-GABA (0,5-1 μCi/) durante 30 min a 37° C. Luego, se lavaron los tejidos con el mismo buffer fresco para remover el exceso de [³H]-GABA. Las retinas

ubicadas en una cámara de 200 μ l de volumen se perfundieron con buffer HEPES-Tris a 37° C a una tasa de 0,4 ml/min y se colectaron fracciones cada 3 min. Luego de 50 min, el buffer de superfusión se reemplazó por otro conteniendo alta concentración de K⁺ (compensado isosmóticamente con la concentración de Na⁺) o glutamato. El medio libre de Na⁺ se obtuvo reemplazando Na⁺ por una concentración equimolar de Li⁺. Para analizar la dependencia de Ca²⁺, se utilizó un buffer de superfusión sin este catión (reemplazado por Mg²⁺) conteniendo 10 mM de EGTA. Finalizado el experimento, los tejidos se digirieron con hidróxido de hiamina. La radioactividad de cada fracción y la incorporada al tejido se determinaron en un contador de centelleo líquido. Los resultados se expresaron como el porcentaje de la radioactividad liberada en cada fracción, respecto al contenido del radioligando. Para calcular la liberación de [³H]-GABA en respuesta a los estímulos estudiados, se estimó el eflujo basal como el promedio de la liberación durante 9 min (3 fracciones) antes y después de la aplicación del estímulo. El 90% de la radioactividad extraída del tejido o colectada durante la superfusión co-migró con un estándar de GABA en cromatografía en capa delgada desarrollada en un sistema conteniendo: n-butanol: ácido acético: agua, 12:5:3 (en volumen).

3.2. Determinación de la liberación de GABA endógeno

Para la determinación de la liberación de GABA endógeno se utilizó el sistema de perfusión descrito en 3.1., con la salvedad de que en este caso se utilizaron de 3 a 5 retinas en la cámara para obtener cantidades detectables del neurotransmisor. El GABA en las fracciones y en los homogenatos de retina se cuantificó por el ensayo de radiorreceptor que se describe más adelante.

3.3. Determinación de la liberación estática de [³H]-GABA

Las retinas se incubaron con [³H]-GABA, (1.000.000-1.500.000 dpm/retina; actividad específica 70 Ci/g) en 500 μ l de buffer HEPES-Tris durante 30 min a 37° C. Finalizada esta incubación, las retinas se lavaron con el mismo buffer fresco para remover el exceso de [³H]-GABA. Luego, se

incubaron durante 20 min con agitación suave en 500 µl del mismo buffer o en un buffer similar pero con una concentración de 50 mM de K⁺ compensado isosmóticamente con la concentración de Na⁺. Para los experimentos sin Ca²⁺ se omitió el catión y se agregó 10 mM de EGTA. Las incubaciones se realizaron con retinas de animales sacrificados en distintos horarios bajo un fotoperíodo normal o expuestos a oscuridad constante durante 48 h antes del experimento, o en presencia o ausencia de diferentes compuestos (NEs, melatonina, o sus respectivos vehículos). Luego de la incubación, se removieron los tejidos y se digirieron con hidróxido de hiamina. La radioactividad del medio y la incorporada al tejido se determinaron en un contador de centelleo líquido. La liberación fraccional se determinó como el cociente de la radioactividad liberada/radioactividad total captada por el tejido. Más del 80% de lo liberado correspondió a GABA auténtico, identificado por cromatografía en capa delgada.

3.4. Ensayo de radiorreceptor para GABA

Alícuotas de 100 µl de una preparación cruda de membranas sinápticas de cerebelo de rata en buffer Tris-citrato, pH 7,2, obtenidas de acuerdo al método descrito (Bernasconi, et al., 1980) se incubaron con 300 µl de las muestras obtenidas por superfusión (fracción de 3 min), 100 µl de un sobrenadante de homogenato de tejido centrifugado a alta velocidad durante 5 min, o con concentraciones conocidas de GABA disueltas en agua destilada. Se agregaron 100 µl de [³H]-muscimol (actividad específica: 27,8 Ci/mmol) en una concentración final de 5 nM. La unión inespecífica se determinó en presencia de 200 µM de GABA. Se incubaron las muestras durante 10 min a 25° C y luego se centrifugaron a 12.000 x g por 10 min a 4° C. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se lavó superficialmente con buffer Tris-citrato frío, pH 7,2. El precipitado se digirió con hidróxido de hiamina durante toda la noche. El rango de detección para GABA fue de 1-20 ng. Los coeficientes de variación intra- e interensayo fueron del 5 y del 20 %, respectivamente. Con el objeto de verificar que la unión del [³H]-muscimol a su receptor fuera desplazada por el GABA de las muestras de tejido y/o fracciones colectadas, muestras de estas preparaciones se incubaron en

forma paralela con GABAasa (una enzima que degrada GABA específicamente) antes del ensayo. Más del 85% tanto del GABA exógeno como del GABA de las muestras fue degradado por la GABAasa.

3.5. Determinación del *turnover* de GABA

La determinación del *turnover* de GABA se realizó mediante la cuantificación de la acumulación del GABA luego de la inhibición de la enzima de degradación, GABA transaminasa (GABA-T) por la administración i.p. de VGB (200 mg/kg), 62,5 min antes del sacrificio. Para prevenir el aumento post-mortem en el contenido de GABA se administró un inhibidor de la enzima de síntesis (GAD), el ácido 3-mercaptopropiónico, 2,5 min antes del sacrificio, en una dosis de 50 mg/kg (i. p.) (Van der Heyden y Korf, 1978). La asunción central de este método es que luego de la administración de γ -vinilGABA, la acumulación de GABA es lineal por al menos 1 h. Un grupo de animales que recibieron una inyección de vehículo (solución salina) 62,5 min antes del sacrificio fueron utilizados para la determinación de las concentraciones de GABA de estado-estacionario. Luego del sacrificio se extrajeron las retinas, se homogeneizaron en forma individual o en grupos en agua destilada, se centrifugaron a 12.000 x g por 15 min y se descartó el *pellet*. Para determinar el contenido de GABA acumulado, se utilizó el ensayo de radiorreceptor que se describió más arriba.

3.6. Determinación del influjo de [^{36}Cl] $^-$

La captación de [^{36}Cl] $^-$ se determinó en sinaptoneurosomas retinianos mediante una modificación del método descrito por Harris y Allan (1985). Las retinas se homogeneizaron con un homogeneizador de vidrio-teflón, en buffer HEPES-Tris. El homogenato se centrifugó a 900 x g durante 15 min a 4° C, se descartó el sobrenadante y el *pellet* se resuspendió en el mismo buffer y se centrifugó bajo las mismas condiciones. El *pellet* final se resuspendió en una cantidad de buffer suficiente como para obtener una concentración de 1- 2 mg de proteínas/ml. Alícuotas de esta suspensión se preincubaron en presencia o ausencia de PS o THDOC durante 10 min a 30° C.

Luego, se agregó [^{36}Cl] $^{-}$ (600.000-900.000 dpm/tubo, actividad específica: 6 mCi/mol) en presencia o ausencia de 10 μM de GABA. Luego de 5 s se frenó el *uptake* por el agregado de 4 ml de buffer frío y se filtró rápidamente a presión reducida a través de filtros Whatman GF/C, que fueron incubados desde el día anterior al experimento en polietilenimina al 0,05% con el fin de reducir la unión inespecífica de [^{36}Cl] $^{-}$. Los filtros se lavaron dos veces más con 4 ml de buffer cada vez y luego se dejaron secar. La radioactividad retenida en el filtro se determinó en un contador de centelleo líquido. La captación inespecífica de [^{36}Cl] $^{-}$ se determinó en ausencia de tejido y se sustrajo a todos los valores.

3.7. Determinación de la actividad de glutámico descarboxilasa

Las retinas se homogeneizaron en forma individual en buffer fosfato 0,05 M, pH 6,8. Alícuotas de los homogenatos (100 μl , 0,20 - 0,4 mg de proteínas) se incubaron en tubos de polipropileno (de 1,5 ml) a 37° C durante una hora. La mezcla de incubación (300 μl) contenía: ácido 1- ^{14}C -L-glutámico (actividad específica: 49,6 Ci/mmol, 0,2 $\mu\text{Ci/ml}$), 200 μM de fosfato de piridoxal, y 10 mM de β -mercaptoetanol. En los casos en los que se determinaron los parámetros cinéticos de esta actividad enzimática, se incluyeron tubos conteniendo concentraciones variables de ácido L-glutámico (0,5 a 2 mM). Las incubaciones se realizaron por triplicado. La reacción se finalizó por agregado de ácido tricloroacético (TCA) al 10%, y el [^{14}C] O_2 liberado durante las siguientes 2 h se capturó en un papel de filtro embebido en hidróxido de hiamina ubicado en la tapa de los tubos de polipropileno. La radioactividad contenida en los filtros se determinó en un contador de centelleo líquido. Los blancos incluyeron todos los reactivos excepto el TCA que se adicionó antes que el homogenato de tejido. Para los estudios cinéticos, el análisis de los resultados se realizó por el método de Lineweaver-Burk y los parámetros se calcularon por regresión lineal.

3.8. Ensayo de *binding* de [^3H]-GABA

El ensayo de unión de [^3H]-GABA se realizó por el procedimiento previamente descrito por Acuña-

Castroviejo y col. (1986a). Grupos de 4 ó 10 retinas se homogeneizaron en 4 ml de agua, y se centrifugaron a 900 x g durante 20 min. El sobrenadante se centrifugó a 20.000 x g por 20 min. El *pellet* se mantuvo a -70° C hasta el ensayo de unión de [³H]-GABA (generalmente dentro de las 18 h). El día del experimento, el *pellet* se resuspendió en 0,05 M de Tris-HCl (pH 7,2), conteniendo Triton X-100 (concentración final: 0,01% v/v). La mezcla se incubó a 37° C durante 30 min. Después de una centrifugación de 20 min a 20.000 x g, el *pellet* resultante se lavó tres veces con Tris-HCl y finalmente se resuspendió en el mismo buffer. Alícuotas de estos homogenatos (0,2 - 0,4 mg de proteínas) se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente en un volumen total de 150 µl. La reacción se inició agregando 10 nM de [³H]-GABA, en presencia o ausencia de concentraciones variables de GABA frío (6 - 200 nM). La unión inespecífica se determinó por la adición de 200 µM de GABA frío. Después de la incubación, la reacción se detuvo por centrifugación de las muestras a 20.000 x g durante 5 min. Se descartó el sobrenadante y el *pellet* se lavó en forma superficial dos veces con 1 ml de buffer Tris-HCl frío. La radioactividad se determinó resuspendiendo el precipitado en 100 µl de hidróxido de hiamina durante toda la noche. La constante de disociación (Kd) y la concentración máxima de sitios de unión (B_{máx}) se determinaron por el método de Scatchard.

3.9. Determinación de la captación de [³H]-GABA

Las retinas se incubaron en forma individual en buffer HEPES-Tris conteniendo [³H]-GABA (0,2-0,4 µCi/ml, actividad específica: 70 Ci/g), durante 10min a 37°C. La captación inespecífica se determinó en presencia de un exceso de GABA frío (10 mM). Las retinas se separaron del medio y se lavaron con abundante buffer fresco. El tejido se pesó, se digirió con hidróxido de hiamina y en la suspensión resultante se determinó la radioactividad.

3.10. Estudios inmunohistoquímicos para la detección de GABA

Este estudio se realizó en colaboración con el Dr. Juan J. López, Instituto de Biología Celular y

Neurociencia, Facultad de Medicina, UBA. Para ello, se anestesiaron diez hámsteres con pentobarbital de sodio (80 mg/kg) y se realizó una perfusión transcardíaca con solución fisiológica (0,9 g/l de NaCl) seguida de 100 ml de 1% de glutaraldehído en buffer fosfato 0,1 M, pH 7,4. Se enuclearon los ojos, se removieron cuidadosamente la córnea y el cristalino, y la porción posterior se fijó otras 2 h en la misma solución. Luego, se incubaron en una solución de sacarosa al 20% en buffer fosfato 0,1 M durante toda la noche. Al día siguiente, el tejido se embebió en OCT (Labonord, Villeneuve d'Ascq, France) y se congeló. Se cortaron secciones de 20 μ m utilizando un crióstato y se montaron sobre portas gelatinizados. Las incubaciones se realizaron en la siguiente secuencia: 20% de suero normal de cabra 1 h a temperatura ambiente, antisuero anti-GABA (gentilmente provisto por el Dr. Peter Somogyi, Medical Research Council, Anatomical Neuropharmacology Unit, Oxford University) diluido 1:2000 durante 36 h a 4° C, IgG anti-conejo de cabra (1:30) durante 4 h a temperatura ambiente y PAP de conejo, diluido 1:100, durante toda la noche a 4° C. Todos los antisueros se diluyeron en buffer Tris (10 mM) - buffer fosfato salino (10 mM). Los lavados se realizaron con el mismo buffer. El producto de reacción se reveló con una solución conteniendo DAB al 0,05%, y H₂O₂ al 0,01% en buffer Tris 10 mM salino, pH 7,4 durante 10 min. En los cortes utilizados como control se omitió la incubación con el anticuerpo primario. Las secciones se deshidrataron y se montaron con Permount. Las imágenes se capturaron en un microscopio Zeiss Axiophot. Con el analizador de imágenes VIDAS-KONTRON se realizó la medición del diámetro de las células amácrinas positivas para GABA en la CNI (n = 50) y en la CCG (n = 50). Estos datos se usaron para calcular el diámetro y el desvío estándar de cada población celular.

3.11. Microscopía electrónica para la detección de GABA

El análisis por microscopía electrónica se realizó en colaboración con el Dr. Juan J. López. Para ello, los tiempos de incubación de la inmunomarcación de las retinas fueron más cortos para mejorar la conservación de la ultraestructura. Las secciones se incubaron con el anticuerpo anti-

GABA durante 16 h y con el anticuerpo secundario y el complejo PAP durante 2 h. Las secciones inmunoteñidas se contrastaron con 1% de OsO₄ y 1% de acetato de uranilo, se deshidrataron y embebieron en Durcupan. Se realizaron cortes ultrafinos de las áreas seleccionadas por microscopía óptica. Las secciones se contrastaron con citrato de plomo y se examinaron en un microscopio electrónico Zeiss 109.

4. Determinación del contenido de melatonina

Las retinas aisladas y separadas de epitelio pigmentario, se incubaron a 37° C durante 8 h, en medio esencial mínimo (MEM), ajustado a pH 7,4 con NaHCO₃ y burbujeado con carbógeno. Las incubaciones se realizaron en condiciones de luz u oscuridad continua durante 8 h en presencia o ausencia de diferentes compuestos. Finalizada la incubación, se aspiraron los medios y las retinas se homogeneizaron en 2 ml de HCl 0,1 M. La extracción de melatonina se realizó mediante la adición de 5 ml de diclorometano. Los tubos se agitaron y se centrifugaron a 900 x g durante 3 min. La fase acuosa se descartó y la fase orgánica se lavó en forma sucesiva con 2 ml de NaHCO₃ (2%) y 2 ml de agua destilada, aspirando la fase acuosa en cada caso. Dos alícuotas de 1,5 ml de la fase orgánica de cada muestra (correspondiente a una retina), se llevaron a sequedad bajo vacío y se guardaron a -20° C hasta que se realizó el radioinmunoanálisis (RIA). Para ello, se resuspendieron las muestras en 100 µl de buffer (3 mM de NaN₃, 0,05 M de KH₂PO₄ y 1 mg/ml de gelatina, llevado a pH 7,0 con KOH). Se agregaron 50 µl de [³H]-melatonina (20.000-24.000 dpm; actividad específica 38,8 Ci/mmol) y 50 µl de un antisuero de conejo anti-melatonina desarrollado en nuestro laboratorio (dilución final 1:1600) y se incubó durante 2 h a 37°C. Finalizada la incubación se agregaron 250 µl de sulfato de amonio saturado, las muestras se agitaron, se incubaron a 4° C durante 40 min y se centrifugaron a 13200 rpm durante 4 min a 4° C. El sobrenadante se aspiró y el precipitado se resuspendió en 100 µl de agua destilada. Los valores de contenido de melatonina se determinaron a partir de una curva estándar de melatonina, con un rango de 20 a 5000 pg/tubo.

5. Determinación del citocromo P450_{scc}

5.1. Western blot

Las retinas y glándulas adrenales se homogeneizaron en buffer conteniendo 250 mM de sacarosa, 20 mM de Tris-HCl, 10 µg/ml de leupeptina, 1 mM de fluoruro de fenil-metil-sulfonilo (PMSF), y 2 µg/ml de pepstatina A, pH 7,4. Después de remover el tejido nuclear por centrifugación a 3.000 x g, se aislaron las mitocondrias por centrifugación a 11.000 x g. El *pellet* se resuspendió en 1 mM de EDTA, 1 mM de EGTA, 1% de Triton, 250 mM de sacarosa, 20 mM de Tris-HCl, 10 µg/ml de leupeptina, 1 mM de PMSF, y 2 µg/ml de pepstatina A, pH 7,4. Se sembraron 80 µg de proteínas de la fracción obtenida de retinas y 1 µg de la fracción de adrenales. Las proteínas se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida (12%) y se electrotransfirieron a membranas de PVDF (45 min a 15V; Bio-Rad Trans-Blot SD system). Las membranas fueron pre-tratadas durante 1 h con solución de bloqueo (1% de BSA en 0,05% de Tween 20, 0,15 M de NaCl, 50 mM de Tris-HCl, pH 7,4, TTBS) a temperatura ambiente y luego se incubaron con un anticuerpo policlonal anti-citocromo P450_{scc} desarrollado en conejo (Chemicon International Inc.) durante toda la noche a 4 °C (dilución 1:1000). Las membranas se lavaron con TTBS 0,5% varias veces, se incubaron con un anticuerpo policlonal de conejo conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) anti-IgG (1:4000) desarrollado en cabra durante 1 h a temperatura ambiente y luego de varios lavados en TTBS se revelaron con el sistema de detección por quimioluminiscencia ECL (ECL Western Blotting Analysis System, Amersham Pharmacia, England.) y posterior autorradiografía.

5.2. Estudio inmunohistoquímico

Los ojos se enuclearon y se fijaron inmediatamente en paraformaldehído (PFA) al 4% en buffer fosfato 100 mM, con 100 mM de NaCl, pH 7,2 (PBS) durante 1 hora. La córnea y el cristalino se removieron cuidadosamente y la porción posterior del ojo se fijó otras 12 h en el mismo buffer. Para crioproteger las muestras se realizaron sucesivas incubaciones en sacarosa 10, 20, y 30%.

Luego, el tejido se embebió en OCT y se congeló. Las secciones de 20 μm se cortaron en crióstato y se montaron sobre portas gelatinizados. La actividad de peroxidasa endógena se bloqueó con H_2O_2 al 0,3% durante 20 min. A continuación, las secciones se incubaron con suero normal de caballo al 2% y BSA al 0,1% durante 1 hora en PBS. Para detectar la presencia de citocromo P450sc, los cortes se incubaron con el mismo anticuerpo usado para el western blot, diluido 1: 1000 en la misma solución que antes durante 48 h a 4° C. La presencia del anticuerpo primario se detectó con un anticuerpo biotilado universal desarrollado en caballo (1: 500, incubado durante 30 min a temperatura ambiente) y una solución con HRP-avidina-biotina (Vectastain Elite ABC; Vector Laboratories). El producto de reacción se reveló con una solución conteniendo DAB al 0,035%, $\text{SO}_4\text{Ni}(\text{NH}_4)$ al 2,5% y H_2O_2 al 0,3% y se visualizó como un precipitado negro. En los cortes utilizados como controles negativos se omitió la incubación con anticuerpo primario. Las secciones se deshidrataron y montaron con bálsamo sintético. Las imágenes se capturaron en un microscopio Olympus BX 50 con una cámara Olympus.

6. Microscopía óptica y análisis de imágenes de la retina y nervio óptico de rata

El análisis histológico de las retinas se realizó en colaboración con el Dr. J. Oscar Croxatto, Laboratorio de Patología, Fundación Oftalmológica Argentina (FOA), "Jorge Malbrán" y el Dr. Hernán Aldana Marcos, Facultad de Medicina, Universidad de Morón. Se analizó un total de 8 ojos/grupo de ratas tratadas con AH o solución fisiológica durante 3, 6 ó 10 semanas. Los ojos se enuclearon luego de una sobredosis de anestesia. Inmediatamente se fijaron por inmersión en PFA al 4% y glutaraldehído al 1% en buffer fosfato (pH 7,2) por 1 hora. Se mantuvo la membrana nictitante para la correcta orientación del corte. Se extrajeron la córnea y el cristalino y el segmento posterior se fijó nuevamente por un período de 12 h en el mismo fijador. Se realizó una sección de nervio óptico a una distancia de 1,5 mm posterior al globo ocular de ojos control o inyectados con AH, que luego se fijó en OsO_4 en buffer fosfato. Los nervios ópticos se procesaron en resina epoxi y cortes de 1 μm se tiñeron con azul de toluidina. Los segmentos posteriores se deshidrataron en

series de alcohol y se embebieron en parafina. Se realizaron cortes de $4\mu\text{m}$ a lo largo del meridiano horizontal por la cabeza del nervio óptico y se tiñeron con hematoxilina-eosina. Las imágenes se capturaron digitalmente con una cámara Sony SSC-DC50 adaptada a un microscopio Nikon Eclipse E4000 (iluminación: 6-V luz halogena, 20W). Las imágenes capturadas se digitalizaron en una matriz de 520×390 píxeles. Luego se transfirieron al sistema de análisis de imagen Scion Image (Scion Corporation Beta 4.0.2, Windows).

La morfometría retiniana se realizó según lo descrito por Takahata y col. (2003) con modificaciones. Se evaluaron tres cortes de cada ojo seleccionados al azar. Se analizaron digitalmente nueve imágenes microscópicas a 1 mm del nervio óptico, en el sector temporal. A la magnificación utilizada, cada campo en el monitor correspondió a un área de tejido de $19318,7 \mu\text{m}^2$ y cada pixel a $0,31 \mu\text{m}$. Se midió el grosor (en μm) de la CPI, de la CNI, de la CNE, y de la retina total. El número de células en la CCG, se calculó por densidad celular lineal (células/100 μm). Para cada ojo, se promediaron los resultados obtenidos de los tres cortes seleccionados y este valor se tomó como representativo de cada grupo ($n = 5$ ojos/ grupo).

La cuantificación de axones del nervio óptico se realizó según lo descrito por Levkovitch-Verbin y col. (2002) con modificaciones. Las imágenes se capturaron con un objetivo acromático de 100X. Se tomaron 10 imágenes de distintas regiones del nervio óptico (2 centrales y ocho periféricas en sentido horario), para determinar la densidad y distribución de los axones. A la magnificación utilizada, cada campo en el monitor correspondió a un área de tejido $3090,99 \mu\text{m}^2$ y cada pixel de la imagen a $0,123 \mu\text{m}$. Se calculó el tamaño de cada axón con su vaina de mielina (diámetro) y la densidad de axones por mm^2 . Se comparó el número de axones por campo entre los animales control y los animales tratados con AH. El número de axones contados en 10 imágenes, representó aproximadamente el 10,6 % del área total del nervio óptico. El análisis morfométrico se realizó por operadores que desconocían el protocolo utilizado en cada ojo.

7. Electrorretinograma en hámsteres y ratas

Para el estudio de las funciones visuales en animales los animales se adaptaron a la oscuridad

durante 2 h. Quince minutos antes del estudio se anestesiaron con hidrocloreto de ketamina (50mg/kg) y hidrocloreto de xilazina (0,5 mg/kg) i.p. bajo luz roja tenue y se dilataron las pupilas con tropicamida al 1% e hidrocloreto de fenilefrina al 2,5%. La córnea se mantuvo hidratada con un goteo intermitente de solución fisiológica para prevenir una queratopatía. Se utilizó un electrodo activo de oro apoyado sobre la córnea y como referencia se utilizó un electrodo de tipo aguja localizado en la base de la oreja ipsilateral. El electrodo de descarga se colocó en la parte de atrás de la cabeza del animal. Los ERGs se obtuvieron simultáneamente para los dos ojos en respuesta a un estímulo luminoso de 4 ms emitido por un fotoestimulador de *leds* con una intensidad máxima de 350 cd.s/m², situado a 15 cm de los ojos del animal en el eje visual. Los registros se amplificaron (ganancia de 100 μ V/división) y se utilizaron filtros (filtro de baja frecuencia: 1,5-Hz, filtro de alta frecuencia: 1000 Hz, filtro de frecuencia alterna de 50 Hz; Akonic BIO-PC, Akonic, Argentina). Cada registro representó la respuesta a un flash de luz único (en hámsteres) o la respuesta promedio a 10 estímulos a una tasa de 0,2 Hz (en ratas). Como se ilustra en la Figura 8 la amplitud de la onda a se determinó desde la línea isoelectrónica hasta el valle de la onda a, en tanto que la amplitud de la onda b se determinó desde el valle de la onda a hasta el pico de la onda b. Las latencias de las ondas a y b se midieron como el tiempo transcurrido desde el estímulo hasta el valle de la onda a o hasta el pico de la onda b, respectivamente.

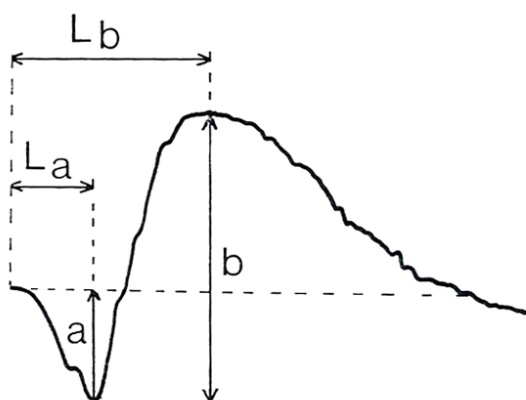


Figura 10. Esquema representativo de un ERG donde se representa la determinación de las amplitudes y latencias de las ondas a y b. El registro comienza en forma simultánea a la aplicación del flash.

En el caso de la evaluación del efecto de los NEs, los hámsteres se inyectaron i.v. con PS (50 μ M), THDOC (50 μ M), bicuculina (400 μ M), VGB (1,5 mM) o vehículo. La droga se inyectó en uno de los ojos y un volumen equivalente de vehículo se inyectó en el ojo contralateral. Los ERGs se

registraron 1 hora después de la inyección intravítrea. Se compararon las respuestas promedio del grupo de ojos control contra el grupo de ojos tratados. En el caso de los hámsteres tratados diariamente con VGB (250 mg/kilo, i.p.), los ERGs se registraron a las 24 h y a las 2, 3, 4 y 5 semanas de tratamiento. En las ratas tratadas con AH o solución salina durante 3, 6, ó 10 semanas, se realizaron electroretinogramas (ERGs) en ambos ojos, luego de tres días de la última inyección.

8. Examen oftalmológico en pacientes epilépticos

Mediante una evaluación oftalmológica detallada realizada bajo la supervisión de la Oftalmóloga María C. Moreno, se excluyeron los ojos de los pacientes con desórdenes visuales de orígenes diversos. Se registró la historia de síntomas visuales, agudeza visual, PIO y oftalmoscopia directa e indirecta. Se evaluó la visión de color monocular usando el test de Ishihara con iluminación constante.

8.1. Campos Visuales en pacientes epilépticos

La evaluación del campo visual se realizó con un campímetro de Humphery (Humphrey Systems INC, San Leandro CA, USA), usando un programa de 120 puntos (*Humphrey 120-Points Full Field Screening Test*) con una excentricidad de 60 grados. El examen del campo visual se realizó sin inducción farmacológica de miosis o midriasis. Los estudios se realizaron de acuerdo con las recomendaciones del proveedor del equipo, usando un estímulo blanco tipo III (4 mm²) contra un fondo de 30,5 abs. de iluminación, con los otros parámetros en sus valores por defecto (blanco de fijación central; chequeo del punto ciego, tipo-III; test de velocidad normal). Todos los pacientes fueron evaluados considerando la edad, la corrección óptica, el diámetro pupilar y la agudeza visual. La fijación se monitoreó usando una cámara infrarroja cada 1 ó 2 min. El tiempo total de estudio fue de 7 min por ojo, aunque se permitieron descansos cuando el paciente lo solicitó. A todos los participantes se les dieron las mismas instrucciones. El estudio fue descartado si el punto ciego no pudo ser ubicado. Dos de los 20 pacientes tratados con VGB y 3 de los 15 pacientes

tratados con CBZ no pudieron colaborar con el estudio. Los estudios se realizaron sin saber los detalles clínicos del paciente. Se consideró un campo visual defectivo cuando se encontró al menos un punto no detectado dentro de los 40° para ambos ojos.

8.2. Electrofisiología en pacientes

Los estudios electroretinográficos se realizaron con un estimulador de tipo flash de acuerdo con los estándares recomendados por la *International Society for the Clinical Electrophysiology and Vision*. Los pacientes se adaptaron durante 20 min a la oscuridad. Cada ojo fue evaluado por separado mientras que el otro ojo se mantenía ocluido. Se utilizó como electrodo activo un electrodo de superficie de oro, tipo hoja, colocado en la piel sobre el canto infraorbital cerca del párpado inferior. Los electrodos de referencia y tierra se colocaron en la región temporal a 2 centímetros de la abertura palpebral y en la frente del paciente, levemente sobre el borde supraorbital, respectivamente. Los ERGs se registraron en respuesta un estímulo de tipo flash (1 Hz intensidad 3 cd/m²). Los ERGs se filtraron entre 1,5 a 800 Hz, y se promedió la respuesta a 10 estímulos. Se promedió la amplitud y la latencia de la onda b en cada uno de los grupos.

Los potenciales occipitales evocados (POEs) se registraron en respuesta a un estímulo tipo damero que invierte los cuadrados blancos por los negros (frecuencia: 1 Hz; tamaño del campo 16°; la señal se registró de 30 a 1,5 Hz). El electrodo activo se ubicó sobre la piel en el lado occipital de la cabeza, el electrodo de referencia en la frente y el electrodo de tierra se ubicó en el canto infraorbital cerca del párpado inferior. Los registros obtenidos son la respuesta promedio a 32 estímulos para cada ojo. En estos registros se determinó la amplitud y la latencia de la onda P 100. Esta onda es una onda positiva que se registra aproximadamente a los 100 ms. Este estudio se realizó en condiciones escotópicas, luego del ERG.

9. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos se utilizaron los tests de Student para la comparación entre dos grupos experimentales o un test de Student apareado, ANOVA seguido de test de Tukey o de

Dunnett, para comparaciones múltiples. En los gráficos de regresión por el método de Scatchard y de Lineweaver Buró, las pendientes y las ordenadas al origen se calcularon por el método de cuadrados mínimos.

Resultados

1. MECANISMO DE LIBERACIÓN DE GABA EN LA RETINA DEL HÁMSTER DORADO

Con el objeto de caracterizar la liberación de GABA en la retina de hámster, en primer lugar se evaluó la liberación dinámica de [³H]-GABA en respuesta a diferentes estímulos. Como se muestra en la Figura 11, la liberación de [³H]-GABA aumentó significativamente en respuesta a glutamato (25 μM), así como frente a un estímulo despolarizante de KCl (30 mM).

Figura 11. Efecto de glutamato (25μM) y de alto potasio (30mM) sobre la liberación dinámica de [³H]-GABA. Las barras indican cuándo la solución de superfusión se reemplazó por 25μM de glutamato (negra) o por 30mM de K⁺ (gris). Cada punto representa el promedio ± ES del porcentaje de [³H]-GABA liberado en cada fracción (n = 6).

Teniendo en cuenta que la liberación de GABA en el sistema nervioso central y en la retina de diversas especies puede ser dependiente o independiente de Ca²⁺ extracelular, se examinó el efecto del alto K⁺ y del glutamato en presencia y ausencia de este catión. En ausencia de Ca²⁺ el efecto del K⁺ (30 y 60 mM) disminuyó significativamente, en tanto que el efecto del glutamato (25 y 100 μM) no se modificó (Figura 12).

Con el objeto de evaluar si en la retina de hámster el [³H]-GABA se comporta en forma similar al GABA endógeno, se analizó el efecto de 60 mM de K⁺ o 100 μM de glutamato sobre la liberación de GABA endógeno. En la Figura 13 se muestra que la inducción de la liberación de GABA por alto K⁺ fue parcialmente dependiente de Ca²⁺ mientras que el efecto del glutamato aumentó significativamente en ausencia de este catión.

Figura 12. Efecto de alto potasio (30 y 60 mM) y glutamato (25 y 100 μM) sobre la liberación de [³H]-GABA (determinada como en la Figura 11) en presencia o ausencia de Ca²⁺. Se representan las medias ± ES del porcentaje de

[³H]-GABA liberado (n = 6). **p < 0,01 test de Student.

Figura 13. Efecto de alto potasio (60mM) y glutamato (100μM) sobre la liberación de GABA endógeno en presencia o ausencia de Ca²⁺. Se representan las medias ± ES del porcentaje de GABA liberado (n = 6). **p < 0,01 test de Student.

Reemplazando sodio por litio en el buffer de superfusión, se evaluó la dependencia de Na⁺ en la liberación de [³H]-GABA inducida por ambos estímulos. En estas condiciones se observó un aumento significativo en la liberación basal de [³H]-GABA. La inducción de la liberación de [³H]-GABA en respuesta a alto K⁺ persistió, en tanto que el glutamato no incrementó este parámetro (Tabla II).

Tabla II. Dependencia de Na⁺ en la liberación de [³H]-GABA

	[³H]-GABA liberado/eflujo basal
K⁺ 60 mM	5,1 ± 0,2
K⁺ 60 mM en ausencia de Na⁺	4,9 ± 0,1
Glutamato 100 μM	2,82 ± 0,05
Glutamato 100 μM en ausencia de Na⁺	1,01 ± 0,2**

Los datos están expresados como el cociente de [³H]-GABA liberado/eflujo basal. Se muestra el promedio ± ES (n = 6). El eflujo basal en estas condiciones fue 3,4 ± 0,1 mientras que en buffer normal fue de 0,31 ± 0,02; ** p < 0,01 comparado con glutamato en presencia de Na⁺, test de Student.

Para identificar el tipo de receptor glutamatérgico involucrado en esta respuesta, se estudió la liberación de GABA en presencia de distintos agonistas y antagonistas específicos. El kainato, un agonista del receptor no-NMDA, aumentó significativamente la liberación de [³H]-GABA, en tanto que el NMDA no tuvo efectos significativos sobre este parámetro, aún en ausencia de Mg²⁺ (datos no mostrados). El DNQX, un antagonista no-NMDA, bloqueó el efecto del glutamato, mientras que el APV, un antagonista NMDA, no modificó este parámetro. Ambos antagonistas carecieron de efecto *per se*. Estos resultados sugieren que el receptor de glutamato involucrado en la liberación retiniana de GABA inducida por glutamato es de tipo no-NMDA (Tabla III).

Tabla III. Efecto de agonistas y antagonistas glutamatérgicos sobre la liberación de [³H]-GABA

	%[³H]-GABA liberado
Liberación basal	0,31 ± 0,02
Glutamato (100 μM)	0,99 ± 0,08**
Kainato 100 μM)	1,21 ± 0,09**
NMDA (100 μM)	0,35 ± 0,02
Glutamato (100 μM) + DNQX (25 μM)	0,32 ± 0,02
Glutamato (100 μM) + APV (100 μM)	0,95 ± 0,05**
DNQX (25 μM)	0,34 ± 0,02
AVP (100 μM)	0,30 ± 0,03

Los datos están expresados como la liberación fraccional de [³H]-GABA. Se muestran las medias ± ES (n = 6). El eflujo basal en estas condiciones fue 3,2 ± 0,1 mientras que en buffer normal fue de 0,33 ± 0,02., ** p < 0,01, comparado con la liberación basal, test de Dunnett.

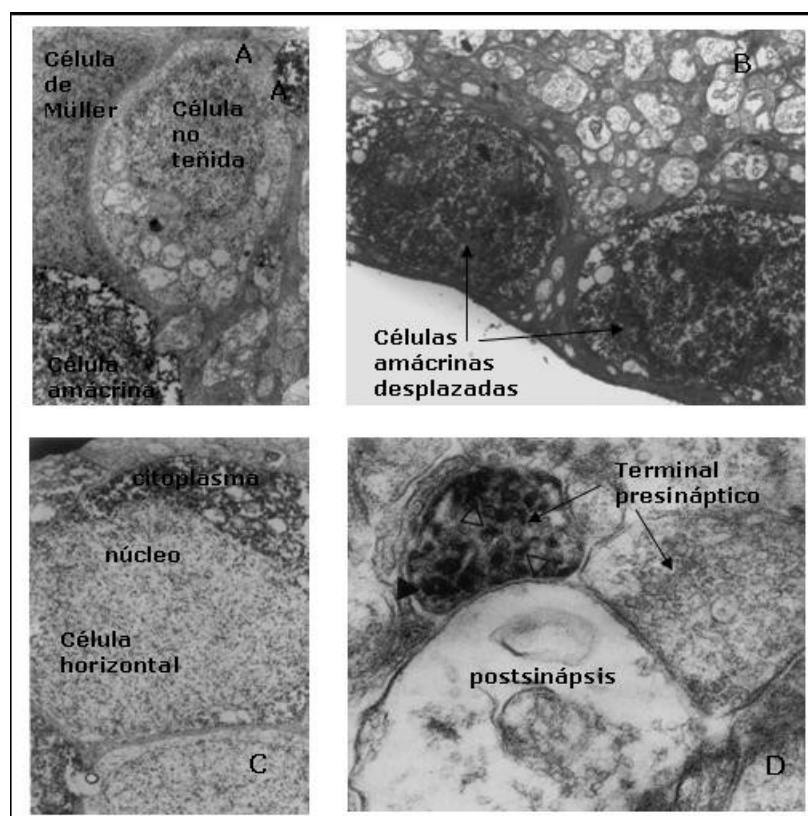
2. LOCALIZACIÓN DE GABA EN LA RETINA DEL HÁMSTER DORADO

2,45; n = 50) y varió entre 9,45 y 20,50 μm . Esta población representó el 30,1% de la población con inmunorreactividad positiva.

Figura 15. Micrográficas electrónicas de una retina de hámster marcada con un anticuerpo anti-GABA.

A) Una célula amácrina inmunorreactiva para GABA. Barra: 1 μm . B) Se observa inmunotinción en el soma de células en la CCG. Barra: 2 μm . C) Célula horizontal cercana a la CPE con marca positiva en el citoplasma, el núcleo permaneció negativo. Barra: 1 μm . D) Terminal positivo en la CPI, en contacto con dos terminales no marcados con vesículas claras. En el terminal con inmunotinción positiva se observan vesículas homogéneamente marcadas así como vesículas con *core* más denso, también se observa inmunoprecipitado en el citoplasma del terminal unido tanto a la membrana celular como al lado citoplasmático de la membrana de las vesículas con *core* denso. Barra: 0,25 μm .

El análisis por microscopía electrónica mostró tinción inmunoespecífica en el citosol de células con



morfología compatible con células horizontales (Figura 15 C). Asimismo, se observó inmunotinción específica en el citosol de células amácrinas, tanto alrededor de las mitocondrias como cerca de la membrana celular (Figura 15 A). También se observaron procesos positivos en células amácrinas. En la CPI se observaron terminales con tinción positiva para GABA, el inmunoprecipitado se observó tanto fuera de las vesículas presinápticas como dentro de ellas. Además se observaron vesículas levemente teñidas con un *core* más denso así como vesículas fuertemente teñidas (Figura 15 D). Finalmente, se detectó inmunotinción para GABA en el citoplasma de células localizadas en

la CCG.

3. REGULACIÓN GABAÉRGICA DEL CONTENIDO DE MELATONINA EN LA RETINA DEL HÁMSTER

Como se mencionara en la Introducción, diversas evidencias experimentales señalan al GABA como una señal retiniana asociada a la oscuridad. Con el objeto de evaluar la posible vinculación entre el sistema GABAérgico y la melatonina, cuya síntesis es máxima durante la noche (Faillace y col., 1994), se analizó el efecto de este neurotransmisor sobre la producción del metoxiindol en la retina de hámster. El GABA, en forma dependiente de la concentración, incrementó significativamente el contenido de melatonina retiniana (Figura 16).

Figura 16. Efecto del GABA sobre el contenido de melatonina en retinas de animales sacrificados a las 12.00 h e incubadas en condiciones de luz durante 8 h, en ausencia o presencia de GABA (1 μ M - 100 μ M). El GABA incrementó significativamente los niveles de melatonina, a partir de una concentración de 10 μ M. Las barras representan las medias \pm ES, n = 15 animales/grupo **p < 0,01; test de Dunnett).

Con el fin de identificar el tipo de receptor GABAérgico involucrado en su efecto sobre la producción de melatonina, se examinó el efecto de diversos agonistas y antagonistas GABAérgicos. El efecto del GABA fue revertido por bicuculina (antagonista de tipo GABA_A) pero no por 2-hidroxisaclofen (antagonista de tipo GABA_B). Por otra parte, el muscimol, agonista GABAérgico de tipo A, aumentó significativamente los niveles de melatonina retiniana, en tanto que el baclofen (agonista del receptor GABA_B) no tuvo efectos significativos (Figura 17).

Figura 17. Efecto del GABA y de agonistas y antagonistas GABAérgicos sobre la producción *in vitro* de melatonina, en condiciones de luz. El GABA incrementó significativamente el contenido de melatonina. La bicuculina revirtió el efecto del GABA; el baclofen no tuvo efectos significativos, en tanto que el 2-hidroxisaclofen no bloqueó el incremento inducido por GABA. El muscimol incrementó significativamente los niveles de melatonina. Las barras representan las medias \pm ES, n = 15 animales/grupo **p < 0,01; test de Dunnett.

En trabajos previos de nuestro laboratorio se demostró que la oscuridad *in vitro* incrementa la producción de melatonina en retinas de hámster aisladas (Faillace y col., 1995). Con el objeto de evaluar la participación del sistema GABAérgico en el estímulo inducido por la oscuridad, se estudió el efecto del GABA así como de antagonistas GABAérgicos y dopaminérgicos sobre la producción de melatonina en estas condiciones. El incremento en el contenido de melatonina inducido por la oscuridad fue parcialmente bloqueado por bicuculina, en tanto que el 2-hidroxisaclofen resultó inefectivo. Por otra parte, el GABA no afectó el contenido de melatonina en las retinas incubadas en oscuridad. La clozapina (antagonista dopaminérgico de tipo D4/D2) no tuvo efecto *per se*, ni afectó la respuesta a la bicuculina (Figura 18).

Figura 18. Efecto del GABA, y de antagonistas GABAérgicos y dopaminérgicos sobre la producción de melatonina en oscuridad. La oscuridad incrementó significativamente el contenido de melatonina respecto a los niveles en luz. La bicuculina revirtió el aumento inducido por la oscuridad, en tanto que el 2-hidroxisaclofen, el GABA y la clozapina fueron inefectivos. La clozapina no modificó el efecto de la bicuculina. Se representan las medias \pm ES, n = 15 animales/grupo. a: $p < 0,01$ comparado con retinas expuestas a luz; b: $p < 0,01$ comparado con retinas expuestas a oscuridad; ANOVA, test de Tukey.

Dado que la bicuculina disminuyó el efecto inducido por la oscuridad sobre el contenido de melatonina y que el GABA fue efectivo sólo en condiciones de luz, resultó posible que el contenido de GABA pudiera variar en función de la hora del día. Por lo tanto, se analizó la concentración de estado-estacionario y la tasa de recambio (*turnover*) de GABA en animales sacrificados a mediodía y a medianoche. El *turnover* de GABA se evaluó por la acumulación del neurotransmisor que resulta de la inhibición de su degradación una hora antes del sacrificio, como se describió en Materiales y Métodos. Tanto el contenido como el *turnover* de GABA fueron significativamente mayores a medianoche que a mediodía (Tabla IV).

Tabla IV. Variaciones día-noche del contenido y del *turnover* de GABA en retina de hámster dorado.

Horario	contenido de GABA (nmol/mg prot)	<i>turnover</i> de GABA (nmol/mg prot/h)
12.00 h	6,5 ± 0,2	13 ± 0,65
24.00 h	8,2 ± 0,3**	18 ± 0,5**

Tanto los niveles como el *turnover* de GABA fueron significativamente mayores a medianoche que a mediodía. Los datos representan las medias ± ES (n = 15 animales por grupo) **p<0,01; test de Student

4. ACTIVIDAD CIRCADIANA DEL SISTEMA GABAÉRGICO RETINIANO

Los resultados anteriores demuestran que tanto la concentración de estado-estacionario como el *turnover* de GABA fueron significativamente mayores a medianoche que a mediodía. Como continuación de estos experimentos se consideró de interés llevar adelante un análisis más detallado de las posibles variaciones GABAérgicas a lo largo del ciclo de luz-oscuridad. Por lo tanto, en los experimentos que se describirán a continuación se analizó la actividad del sistema GABAérgico intrarretiniano desde una perspectiva cronobiológica.

4.a. Variaciones diarias en la actividad GABAérgica retiniana

En una primera etapa, se examinó la existencia de variaciones en el *turnover* retiniano de GABA a intervalos de 4 h durante el ciclo de luz-oscuridad. Los resultados obtenidos se representan en la Figura 19. El *turnover* de GABA varió significativamente a lo largo del ciclo de luz-oscuridad con valores mayores en la fase de oscuridad que en la fase de luz.

0100090000037800000002001c0000000000400000003010800050000000b0200000000050000000c020
f08f106040000002e0118001c000000fb021000070000000000bc02000000000102022253797374656d000
8f1060000c96e0000fc5b110004ee8339e0718a020c020000040000002d01000004000000020101001c000
000fb029cff000000000000900100000000440001254696d6573204e657720526f6d616e0000000000000
0000000000000000000040000002d010100050000000902000000020d000000320a5a00000001000400
00000000ef060f0820002d00040000002d010000030000000000**Figura 19.** Variaciones diarias en el
turnover de GABA en la retina de hámsteres mantenidos en un fotoperíodo de 14 h luz- 10 h oscuridad

(L-O). Los valores del *turnover* de GABA a las 08.00 y 12.00 h fueron significativamente menores que en el resto de los horarios examinados. Los valores indican las medias \pm ES, n = 15 animales/grupo **p < 0,01; test de Tukey.

A continuación, se examinó la existencia de variaciones en la concentración de estado-estacionario de GABA en función de la hora del día. Este parámetro varió significativamente a lo largo del ciclo de luz-oscuridad (Figura 20).

Figura 20. Variaciones diarias en la concentración de estado-estacionario de GABA en la retina de hámsteres mantenidos en L-O. La concentración de GABA a las 08.00 y 12.00 h fue significativamente menor que en el resto de los horarios examinados. Los valores indican las medias \pm ES, n = 15 animales/grupo **p < 0,01; test de Tukey.

Dado que la determinación del *turnover* de GABA se basó en la cuantificación del contenido acumulado del neurotransmisor luego de la inhibición de su degradación, es posible que los cambios observados fueran debidos a variaciones en la actividad de la enzima que cataliza la síntesis de GABA, la glutámico descarboxilasa (GAD). Por lo tanto, se examinó la actividad de GAD retiniana a mediodía y a medianoche. Los resultados obtenidos indican que la $V_{m\acute{a}x}$ de esta actividad enzimática fue significativamente mayor a las 24.00 h que a las 12.00 h, en tanto que el K_m no varió entre ambos horarios (Figura 21 y Tabla V).

Figura 21. Variaciones día-noche en la actividad de la GAD en retinas de hámsteres mantenidos en L-O. Las pendientes y ordenadas al origen se calcularon por el método de cuadrados mínimos. Los puntos representan los valores promedio de triplicados usando 1 retina/punto. La diferencia entre triplicados fue menor al 10%. En este experimento, representativo de 4, la $V_{m\acute{a}x}$ fue 1.05 nmol/min/mg prot. y 1.64 nmol/min/mg prot. a las 12.00 y 24.00 h, respectivamente, y el K_m fue 2.0 mM (a las 12.00 h) y 2.14 mM (a las 24.00 h).

Tabla V. Actividad de GAD en retinas de hámster

Horario	V_{máx.} (nmol/min/mg proteínas)	K_m (mM)
12.00 h	1,02 ± 0,06	2,01 ± 0,3
24.00 h	1,58 ± 0,07**	2,20 ± 0,2

Los animales se sacrificaron en los horarios indicados. Los datos representan los valores promedio de cuatro experimentos. Se representan las medias \pm ES (n = 4). El K_m no presentó variaciones significativas, en tanto que la V_{máx} a las 24.00 h fue significativamente mayor que a las 12.00 h. (**p<0,01; test de Student).

En la Figura 22 se representa la liberación basal y estimulada por alto K⁺ (50 mM) en retinas de animales sacrificados a mediodía y a medianoche. En este experimento (y en los siguientes ensayos de liberación de GABA) la liberación de GABA se realizó en forma estática dado que, para este parámetro, se obtuvieron valores similares a los obtenidos en experimentos de liberación dinámica. Si bien la liberación de [³H]-GABA aumentó significativamente en ambos horarios en respuesta al estímulo despolarizante (p<0,01), este parámetro fue significativamente mayor a las 24.00 h que a las 12.00 h.

Figura 22. Variaciones día-noche en la liberación de [³H]-GABA basal e inducida por alto potasio en animales mantenidos en L-O. La liberación de [³H]-GABA inducida por potasio fue mayor a las 24.00 h que a las 12.00 h. No se observaron diferencias significativas en la liberación basal de [³H]-GABA. Se representan las medias \pm ES (n = 12 animales por grupo). ** p < 0,01 respecto al estímulo de K⁺ a las 12.00 h, test de Student.

En la Figura 23 se representan las variaciones diarias en la unión específica de [³H]-GABA a membranas retinianas de animales sacrificados a lo largo del ciclo de 24-h. Este parámetro varió significativamente con valores máximos durante el día.

Figura 23. Variaciones diarias en el *binding* de [³H]-GABA en retinas de animales sacrificados a lo largo del ciclo luz-oscuridad. Los valores a las 8.00 h y a las 12.00 h fueron significativamente mayores que en el resto de los horarios. Se representan las medias \pm ES (n = 12 animales/grupo), ****p<0,01**, ANOVA, test de Tukey.

Para determinar si los cambios en el *binding* de GABA eran debidos a cambios en el número de sitios receptores o a cambios en la afinidad del GABA por su receptor se realizó un análisis de Scatchard (Figura 24). En la Tabla VI se representan los parámetros cinéticos del receptor GABAérgico retiniano en animales sacrificados a mediodía y a medianoche. Los resultados obtenidos indican que las variaciones diarias observadas en el *binding* de [³H]-GABA podrían atribuirse a un aumento significativo en la concentración total de sitios receptores dado que la B_{máx} fue significativamente mayor a las 12.00 h que a las 24.00 h, en tanto que no se observan cambios en el K_d.

Figura 24. Variaciones diarias en el *binding* de [³H]-GABA en retinas de hámsteres mantenidos en L-O. Las pendientes y ordenadas al origen se calcularon por el método de cuadrados mínimos. Cada punto representa la media de triplicados usando 10 retinas/grupo. En este experimento, representativo de 4, los valores de K_d fueron 38 y 40 nM y la B_{máx} fue 465 y 193 fmol/mg prot. a las 12.00 y a las 24.00h respectivamente.

Tabla VI. Parámetros cinéticos del *binding* de [³H]-GABA en retinas de animales sacrificados a las 12.00 y 24.00 h.

Horario	B_{máx} (fmol/mg proteínas)	K_d (nM)
12.00 h	450 \pm 25**	40 \pm 4
24.00 h	185 \pm 20	35 \pm 3

Los valores de B_{máx} y K_d se obtuvieron a partir del análisis de Scatchard, utilizando 6 concentraciones diferentes del ligando (6-200 nM). Se muestran las medias \pm ES (n = 4 experimentos) usando 10 retinas/grupo. La B_{máx} a las 12.00 h fue significativamente mayor que a las 24.00 h. ****p<0,01**, test de Student.

4.b. Estudio de las variaciones diarias de parámetros GABAérgicos en condiciones de oscuridad constante.

Con el objeto de discriminar si las variaciones diarias observadas en la actividad GABAérgica eran reguladas por la señal luminosa o alternativamente por un reloj circadiano endógeno, se examinaron las variaciones del *turnover*, de la liberación inducida por alto K⁺ y del *binding* de GABA en retinas de animales sacrificados luego de una exposición a oscuridad constante durante 48 h. El *turnover* de GABA varió significativamente en función de la hora del sacrificio con valores mínimos durante el día subjetivo (Figura 25).

Figura 25. Variaciones circadianas del *turnover* de GABA en la retina de hámsteres mantenidos en oscuridad constante (O-O) durante dos días antes del sacrificio. El *turnover* de GABA varió significativamente en función de la hora del sacrificio ($p < 0,01$, ANOVA). Los valores a las 08.00 y 12.00 h fueron significativamente menores que el resto de los horarios. Los valores indican las medias \pm ES, $n = 15$ animales/grupo. $**p < 0,01$; test de Tukey.

A continuación, se examinó la liberación de [³H]-GABA inducida por alto K⁺ a mediodía y a medianoche subjetivos (Figura 26). La liberación del neurotransmisor fue significativamente mayor a las 24.00 h que a las 12.00 h.

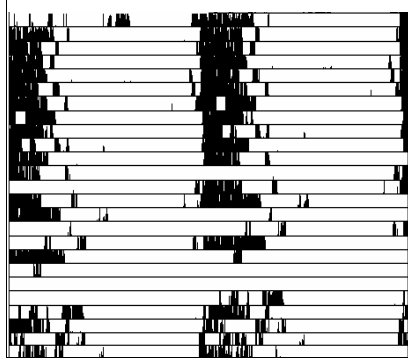
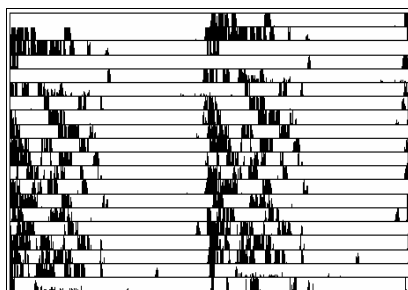
Figura 26. Variaciones circadianas en la liberación de [³H]-GABA basal e inducida por alto potasio en animales mantenidos en O:O. La liberación de [³H]-GABA inducida por potasio fue mayor a medianoche que a mediodía subjetivo. No se observaron diferencias significativas en la liberación basal de [³H]-GABA. Se representan las medias \pm ES del porcentaje de liberación fraccional de [³H]-GABA ($n = 12$ animales por grupo). $** p < 0,01$ respecto al día subjetivo, test de Student.

Asimismo, se examinó la existencia de variaciones circadianas en el *binding* específico de [³H]-GABA en la retina de animales mantenidos en oscuridad constante. Los valores de este parámetro fueron significativamente mayores durante la fase temprana del día subjetivo que en el resto de los horarios examinados (Figura 27).

Figura 27. Variaciones circadianas del *binding* de [³H]-GABA en retinas de animales mantenidos en oscuridad constante durante dos días antes del sacrificio. Se representan las medias \pm ES (n = 12 animales/grupo). Este parámetro varió circadianamente en forma significativa (p <0,01; ANOVA). Los valores a las 8.00 h y a las 12.00 fueron significativamente mayores que en el resto de los horarios. **p<0,01; test de Tukey.

4.c. Participación del sistema GABAérgico retiniano en la respuesta circadiana a la luz

Como se demostró, el sistema GABAérgico retiniano en el hámster varía circadianamente. A partir de estas evidencias, y teniendo en cuenta el rol central de este sistema en el procesado de la información fótica, se consideró de interés examinar la relevancia del ritmo retiniano de GABA en el tráfico de información a los NSQ, el reloj “maestro” del sistema circadiano. Para ello y con el objeto de alterar el ritmo del *turnover* de GABA y evaluar las consecuencias sobre la actividad circadiana, los hámsteres mantenidos en *free running*, se inyectaron (i.v.) con un inhibidor de la degradación de GABA, la vigabatrina (VGB), a CT 17 (un horario en el cual los niveles retinianos



de GABA son comparativamente bajos respecto a los niveles observados durante la noche subjetiva temprana (Figura 25). Una hora después de la inyección, se aplicó un pulso de luz de 10 minutos a los animales inyectados con VGB o con vehículo (solución fisiológica). Otro grupo de animales fue tratado en forma análoga pero sin pulso de luz. Luego, se comparó la magnitud del adelanto de fase en cada grupo de animales. En la Figura 28 A y B se muestran los actogramas representativos de los adelantos de fase en respuesta a la luz, luego de la administración aguda de VGB o vehículo en la cámara vítrea.

Figura 28. Actogramas representativos del efecto de la inyección i.v. de VGB o vehículo sobre los cambios de fase inducidos por un pulso de luz (10 min, 50 lux) aplicado a CT 18. La inyección i.v. de VGB o vehículo se realizó a CT 17. A) Animales tratados con solución fisiológica y luego con VGB. B) Animales tratados con VGB y luego con solución fisiológica. C) Animales tratados con solución fisiológica y luego con VGB, sin pulso de luz. Los registros de actividad locomotora se graficaron en un eje de 48 h para su mejor visualización. 0100090000037800000002001c0000000000400000003010800050000000b02000000005000000c020f08f10604000002e0118001c00000fb021000070000000000bc0200000000102022253797374656d0008f1060000c96e0000fc5b110004ee8339e0718a020c020000040000002d0100004000000020101001c00000fb029cff00000000000900100000000440001254696d6573204e657720526f6d616e004000002d01010005000000090200000020d000000320a5a00000010004000000000ef060f0820002d00040000002d010000030000000000 La señal en cruz representa el día de tratamiento. 0100090000037800000002001c0000000000400000003010800050000000b02000000005000000c020f08f10604000002e0118001c00000fb021000070000000000bc0200000000102022253797374656d0008f1060000c96e0000fc5b110004ee8339e0718a020c020000040000002d0100004000000020101001c00000fb029cff00000000000900100000000440001254696d6573204e657720526f6d616e004000002d01010005000000090200000020d000000320a5a00000010004000000000ef060f0820002d00040000002d010000030000000000

Como se muestra en la Figura 29, la VGB disminuyó significativamente la magnitud del adelanto de fase inducido por un pulso de luz a CT 18 en animales inyectados i.v. una hora antes del pulso de luz. La VGB *per se* no produjo cambios de fase en ausencia del estímulo luminoso.

Figura 29. Efecto de la inyección i.v. de VGB (2µl 1,5 mM) o vehículo (2 µl) sobre los cambios de fase inducidos por

pulsos de luz (10 min, 50 lux) aplicado a CT 18. La VGB disminuyó significativamente la magnitud del adelanto de fase provocado por la luz. Se muestran las medias \pm ES, $n = 6$ * $p < 0,05$ test apareado de Student.

5. MODULACIÓN DEL SISTEMA GABAÉRGICO

5. a. Efecto de la melatonina sobre la neurotransmisión GABAérgica en la retina de hámster

El objetivo de los experimentos que se describirán a continuación fue analizar el efecto de la melatonina sobre la actividad del sistema GABAérgico en la retina del hámster dorado. En primer lugar se examinó el efecto de la melatonina sobre el *turnover* retiniano de GABA. Para ello, los animales se inyectaron por vía intravítrea con melatonina y se sacrificaron 2 h más tarde. Como se muestra en la Figura 30, la melatonina incrementó significativamente este parámetro.

Figura 30. Efecto de la melatonina sobre el *turnover* de GABA en la retina de hámster. La melatonina (concentración final: 10 y 100 nM) se inyectó en la cámara vítrea, 2 h antes del sacrificio. La melatonina (100 nM) incrementó significativamente el *turnover* de GABA. Las barras representan las medias \pm ES, $n = 10$ animales/grupo (** $p < 0,01$; test de Dunnett).

Estos resultados sugieren que la melatonina podría estimular la actividad de la enzima que cataliza la síntesis de GABA (GAD). Para evaluar este aspecto se inyectaron hámsteres con las mismas dosis de melatonina (i.v.) que en el experimento anterior y luego de 2 h se determinó la síntesis de GABA *in vitro* a partir de 1-L-[14 C]-glutamato. Los resultados obtenidos indican que la melatonina aumentó significativamente la actividad de la GAD en una concentración de 100 nM (Figura 31).

Figura 31. Efecto de la melatonina sobre la actividad de la GAD en retinas de hámster. La melatonina inyectada en la cámara vítrea 2 h antes del sacrificio en una concentración de 100 nM aumentó significativamente la actividad de la GAD. A 10 nM la melatonina resultó inefectiva. Se representan las medias \pm ES (n = 8 animales/grupo). ****p<0,01** test de Dunnett.

A continuación, se analizó el efecto *in vitro* de la melatonina sobre la liberación de [³H]-GABA inducida por alto potasio. La melatonina no tuvo efecto sobre este parámetro, como se muestra en la Figura 32.

Figura 32. El alto K⁺ indujo un aumento significativo de este parámetro pero la melatonina no lo modificó. Se representan las medias \pm ES; (n = 8 animales/grupo), ****p<0,01** test Student, respecto al basal.

La melatonina tampoco afectó el influjo de [³H]-GABA, como se muestra en la Figura 33.

Figura 33. La melatonina 100 nM no tuvo efecto significativo sobre el influjo de [³H]-GABA. Se representan las medias \pm ES (n = 8 animales/grupo)

Finalmente, se examinó el efecto de la melatonina sobre la respuesta postsináptica GABAérgica. Para ello, se analizó el efecto del metoxiindol sobre el *uptake* de $[^{36}\text{Cl}]^-$ inducido por GABA en sinaptoneurosomas retinianos. La melatonina (10 nM) que careció de efecto *per se*, incrementó significativamente el efecto del GABA sobre el influjo de Cl^- (Figura 34).

0100090000037800000002001c0000000000400000003010800050000000b02000000005000000c020f08f10604000
0002e0118001c000000fb021000070000000000bc0200000000102022253797374656d0008f1060000c96e0000fc5b11
0004ec8339e0718a020c020000040000002d01000004000000020101001c000000fb029cff0000000000090010000000
00440001254696d6573204e657720526f6d616e000000000000000000000000000000000040000002d0101000500000
00902000000020d0000000320a5a0000000100040000000000ef060f0820002d00040000002d010000030000000000

Figura 34. Efecto de la melatonina sobre el influjo de $[^{36}\text{Cl}]^-$ en sinaptoneurosomas retinianos. El GABA aumentó significativamente este parámetro. La melatonina (10 nM) que no tuvo efecto *per se*, aumentó significativamente el influjo de $[^{36}\text{Cl}]^-$ en presencia de GABA. Se representan las medias \pm ES (n = 15); a: $p < 0,01$ respecto al basal; b: $p < 0,01$ respecto al influjo de $[^{36}\text{Cl}]^-$ en presencia de GABA; ANOVA, test de Tukey.

5. b. Efectos de los neuroesteroides (NEs) sobre el sistema GABAérgico retiniano

Para el estudio del efecto de NEs, se utilizaron dos miembros de esta familia: la PS (un modulador GABAérgico negativo) y la THDOC (un modulador positivo de este sistema). La Figura 35 muestra el efecto de la THDOC y la PS (1 y 10 μM) sobre el influjo de $[^{36}\text{Cl}]^-$ inducido por GABA en sinaptoneurosomas retinianos. La THDOC aumentó, en tanto que la PS disminuyó significativamente este parámetro. La THDOC y la PS fueron inefectivas a una concentración de 0,1 μM y carecieron de efecto *per se*.

Figura 35. Efecto de la THDOC y la PS sobre el influjo de $[^{36}\text{Cl}]^-$ en sinaptoneurosomas retinianos. El GABA (10 μM) aumentó significativamente este parámetro. La PS disminuyó y la THDOC aumentó significativamente el influjo de $[^{36}\text{Cl}]^-$ inducido por GABA. La PS y la THDOC no tuvieron efecto *per se* (en ausencia de GABA). Se representan las medias \pm ES (n = 15), * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ ANOVA, test de Tukey.

A continuación, se analizó el efecto de ambos NEs sobre la liberación retiniana de GABA inducida por concentraciones despolarizantes de K^+ (50mM). La THDOC disminuyó en tanto que la PS aumentó significativamente la liberación fraccional de $[^3H]$ -GABA inducida por despolarización (Figura 36). Ambos NEs fueron inefectivos *per se* (resultados no mostrados).

Figura 36. Efecto de la PS y la THDOC sobre la liberación fraccional de $[^3H]$ -GABA. La PS aumentó en tanto que la THDOC disminuyó significativamente la liberación de $[^3H]$ -GABA inducida por alto K^+ . Los NEs no modificaron la liberación basal del neurotransmisor. Se representan las medias \pm ES, (n = 15 retinas/grupo) a: $p < 0,01$ respecto al basal; * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ respecto a alto K^+ (50mM), ANOVA, test de Tukey.

El efecto de ambos NEs sobre la liberación de $[^3H]$ -GABA fue dependiente de Ca^{2+} , dado que en ausencia del catión ninguno de estos NEs modificaron este parámetro (Figura 37).

Figura 37. Efecto de la PS y la THDOC sobre la liberación fraccional de $[^3H]$ -GABA en ausencia de Ca^{2+} . En estas condiciones, los NEs no modificaron la liberación del neurotransmisor. Se representan las medias \pm ES; (n = 15 retinas/grupo), ** $p < 0,01$, test de Dunnett.

Para evaluar si el efecto descrito era específico de la retina, se analizó el efecto de ambos NEs sobre la liberación de GABA en el hipotálamo de hámster. También en este caso, la THDOC disminuyó y la PS aumentó significativamente la liberación fraccional de $[^3H]$ -GABA inducida por despolarización (Figura 38). Ambos NEs fueron inefectivos *per se* y a una concentración de 0,1 μM

(resultados no mostrados).

Figura 38. Efecto de la PS y la THDOC sobre la liberación fraccional de [³H]-GABA en el hipotálamo de hámster. La PS aumentó y la THDOC disminuyó significativamente la liberación de [³H]-GABA inducida por alto K⁺. Los NEs no modificaron la liberación basal del neurotransmisor. Se representan las medias de la liberación fraccional ± ES, (n = 15 retinas/grupo) a: p<0,01 respecto al basal; **p<0,01 respecto a alto K⁺ (50mM), ANOVA, test de Tukey.

Para evaluar el efecto de ambos NEs sobre la función retiniana, se registraron ERGs escotópicos en animales inyectados con PS o THDOC en la cámara vítrea. Asimismo, y con el objeto de comparar la respuesta electroretinográfica de los NEs con la de GABA, se inyectaron animales con VGB o bicuculina. En la Figura 39 se muestran ERGs representativos de animales inyectados i.v. con PS, THDOC, VGB o bicuculina.

La PS y la VGB disminuyeron y la THDOC y la bicuculina aumentaron significativamente la amplitud de la onda b del ERG (Figura 40). Ninguno de estos tratamientos afectó las latencias de las ondas a y b ni la amplitud de la onda a (datos no mostrados).

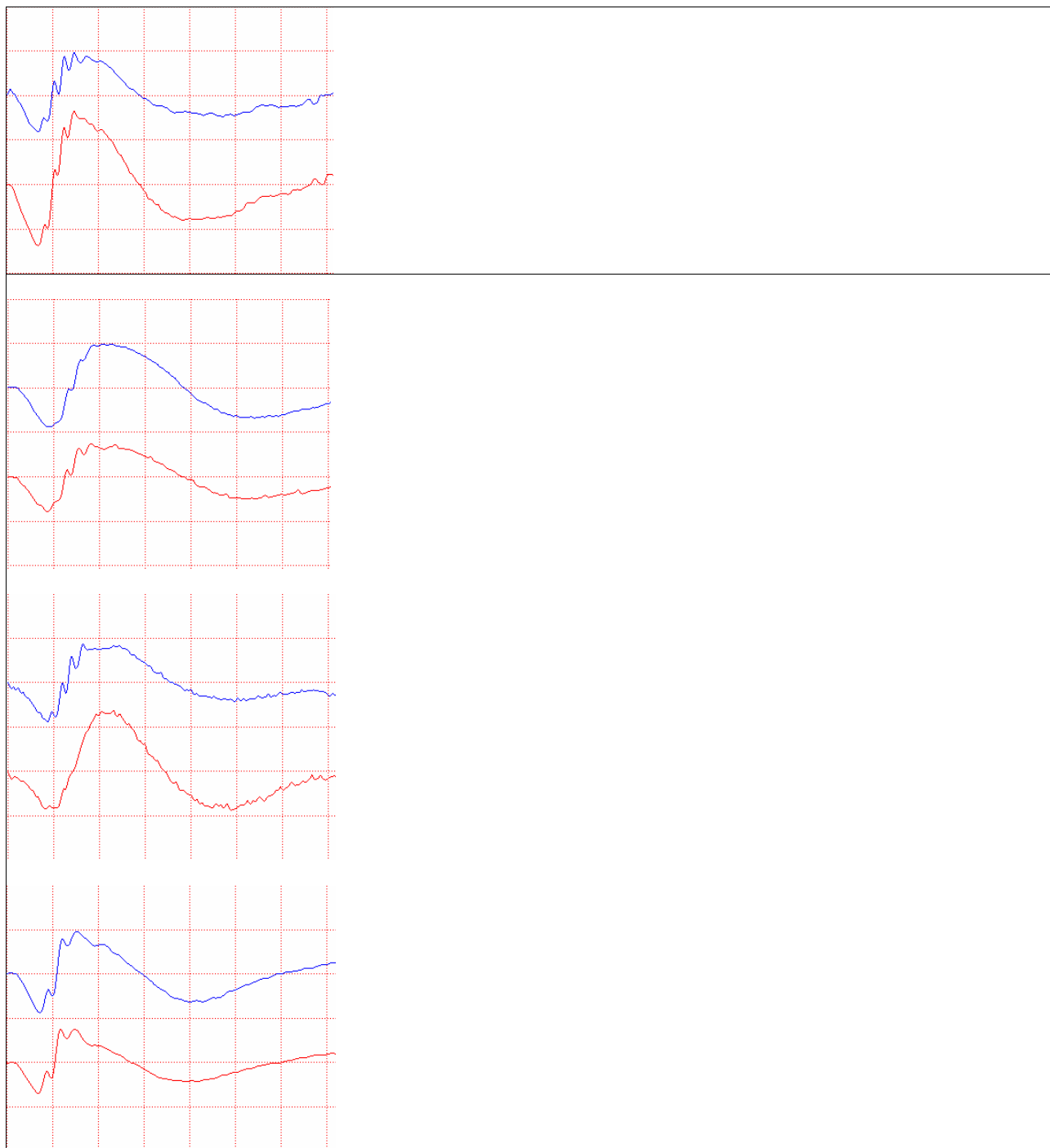


Figura 39. ERGs escotópicos representativos de ojos control o tratados (i.v.) con A) THDOC (50 μ M); B) PS (50 μ M); C) bicuculina (400 μ M); D) VGB (1,5mM). Los animales se inyectaron (2 μ l, i.v.) con la droga correspondiente 1 h antes del estudio.

Figura 40. Efecto de THDOC, PS, bicuculina y VGB sobre la amplitud de la onda b del ERG escotópico. La PS y la VGB disminuyeron significativamente este parámetro, mientras que la THDOC y la bicuculina lo aumentaron. Se representan las medias \pm ES (n = 10). **p<0,01. ANOVA, test de Tukey

Con el objeto de evaluar la biosíntesis de NEs en la retina de hámster se analizó la presencia y la localización de una de las enzimas limitantes de la esteroidogénesis, el citocromo P450_{scc}, que cataliza la ruptura de la cadena lateral del colesterol. En la Figura 41A se observa una banda inmunorreactiva positiva para un anticuerpo específico anti-P450_{scc} cuyo peso molecular correspondió al de una señal positiva en glándula adrenal de hámster. En el estudio inmunohistoquímico se observó una marcación intensa en somas ubicados a la CNI y la CCG. No se observó inmunomarcación evidente en otras capas retinianas (Figura 41 B, C, D y E).

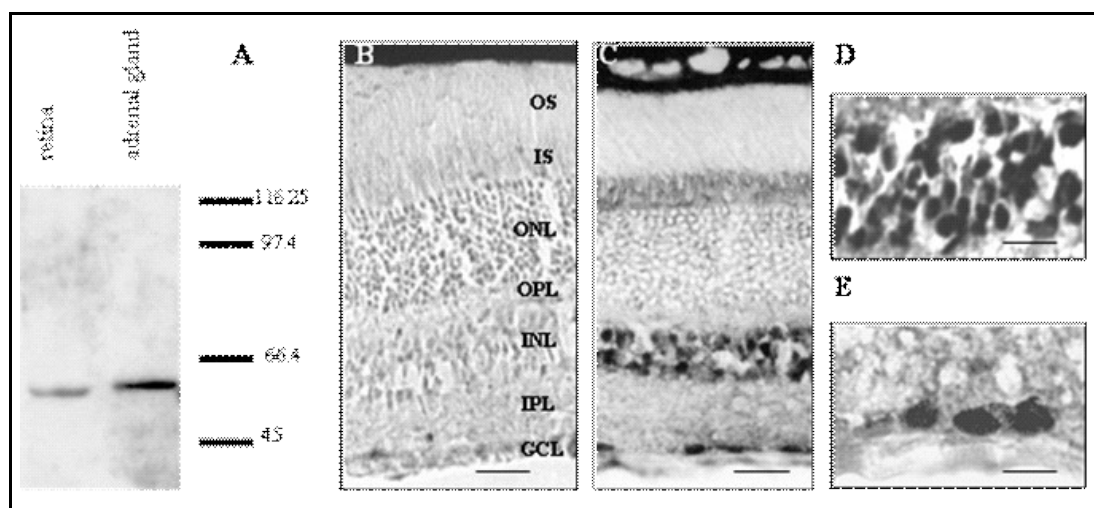


Figura 41. Western blot e inmunohistoquímica de citocromo P450_{scc} en retina de hámster. A) En las fracciones retinianas se observó una banda inmunorreactiva con un peso molecular correspondiente al del citocromo P450_{scc} de la glándula adrenal de hámster (\cong 56 kD). Localización inmunohistoquímica del citocromo P450_{scc} en retina de hámster. B) control, C) inmunoreactividad positiva en células localizadas en la CCG y células en la CNI. D) detalle de la CNI. E) detalle de la CCG.

6. EL SISTEMA GABAÉRGICO BAJO CONDICIONES PATOLÓGICAS

6. a. Estudio de las funciones visuales en pacientes epilépticos tratados crónicamente con VGB

Trabajos de otros autores demostraron que el tratamiento crónico de pacientes epilépticos con VGB provoca una disfunción visual. Este estudio no había sido previamente realizado en nuestro país, aun cuando esta droga se utiliza con fines terapéuticos, en forma relativamente frecuente. Por lo

tanto, en colaboración con el “Centro Municipal de Epilepsia” del Hospital “Ramos Mejía” se examinaron las funciones visuales de 20 pacientes epilépticos tratados con VGB, que se analizaron comparativamente con un grupo de 15 pacientes tratados crónicamente con carbamazepina (CBZ). En la Tabla VII se indican los datos clínicos y demográficos de los pacientes que participaron en el estudio.

Tabla VII. Datos clínicos y demográficos de los pacientes

Pa- cien- te #	edad	sexo	duración de la enfermedad	tipo de crisis epiléptica	síndromes relacionados con la localización	duración tratamiento con VGB	dosis (mg/d)	otras drogas
1	19	M	19 años	SPS, CPS, 2° TCS	FLE	3 años	2500	OXC, TPM
2	23	M	8 años	CPS	PLE	2 años	3000	CBZ
3	33	F	14 años	SPS, CPS	FLE	4 años	4000	VPA
4	43	M	35 años	CPS	FLE	8 años	4000	VPA
5	28	F	20 años	CPS	TLE	5 años	1500	CBZ
6	20	M	16 años	CPS	TLE	4 años	4000	LMT, OXC
7	30	F	20 años	CPS	TLE	4 años	2000	CBZ
8	25	M	25 años	SPS, CPS	FLE	5 años	1500	CBZ, VPA
9	26	F	18 años	CPS	TLE	2 años	2000	OXC
10	49	F	22 años	CPS	TLE	2 años	4000	CBZ, CNZ
11	25	M	16 años	SPS, CPS	OLE	6 años	3000	CBZ
12	34	M	20 años	CPS	TLE	6 años	1500	CBZ, CNZ
13	23	M	2 años	SPS, CPS	TLE	2 años	1000	CBZ
14	29	M	26 años	CPS	TLE	2 años	4000	CBZ
15	32	M	22 años	SPS, 2° TCS	TLE	1 año	1500	CBZ, CNZ
16	26	M	13 años	SPS, CPS, 2° TCS	FLE	2 años	2000	CBZ, PHT
17	26	F	16 años	CPS	FLE	5 años	2000	CBZ, CNZ
18	26	M	5 años	CPS	TLE	2 años	3000	CBZ
19	23	F	23 años	SPS, CPS, 2° TCS	FLE	6 años	3000	CBZ
20	20	F	12 años	SPS, CPS, 2° TCS	OLE	3 años	3500	CBZ, DZP
21	15	M	2 años	CPS, 2° TCS	OLE	-	-	CBZ (1,2 g)
22	21	F	4 años	CPS	PLE	-	-	CBZ (0.8 g)
23	35	M	13 años	CPS	PLE	-	-	CBZ (1.0 g)
24	20	M	7 años	CPS	FLE	-	-	CBZ (1,4 g)
25	21	M	25 años	CPS, 2° TCS	FLE	-	-	CBZ (1.0 g)
26	23	F	4 años	SPS, CPS	FLE	-	-	CBZ (1,2 g)
27	52	M	35 años	CPS	FLE	-	-	CBZ (0.8 g)
28	25	M	10 años	CPS	TLE	-	-	CBZ (1.0 g)
29	20	F	16 años	CPS	FLE	-	-	CBZ (1,2 g)
30	30	F	18 años	CPS	TLE	-	-	CBZ (1.0 g)
31	20	F	5 años	SPS, CPS	FLE	-	-	CBZ (1,2 g)
32	26	F	18 años	CPS	TLE	-	-	CBZ (0.8 g)
33	40	M	20 años	CPS	TLE	-	-	CBZ (1,4 g)
34	25	F	16 años	SPS, CPS	OLE	-	-	CBZ (0.8 g)
35	30	M	10 años	CPS	PLE	-	-	CBZ (1.0 g)

Abreviaturas: SPS: crisis parcial simple; CPS: crisis parcial compleja; 2° TCS: crisis parciales complejas con evolución a crisis tónico-clónicas generalizadas secundariamente; TLE: epilepsia del lóbulo temporal; OLE: epilepsia del lóbulo occipital, PLE: epilepsia del lóbulo parietal; FLE: epilepsia del lóbulo frontal; CBZ: carbamazepina; OXC: oxocarbazepina; CNZ: clonazepam; DZP: diazepam, VPA: ácido valproico; PH: fenobarbital.

Las edades del grupo de VGB variaron entre 19 a 49 años con una edad promedio de $28 \pm 7,4$ años. En este grupo, 8 fueron mujeres. En el grupo CBZ, en el que participaron 3 mujeres, las edades fueron de 15 a 52 años con una edad promedio de $26,8 \pm 9,5$. La duración promedio del tratamiento con VGB fue de $3,7 \pm 1,9$ años (rango: 1 a 8 años). Ninguno de los pacientes refirió alteraciones visuales en el interrogatorio inicial. Todos los pacientes (considerando ambos grupos) tuvieron una agudeza visual de 20/20 con corrección óptica, excepto la paciente # 20 que presentó un glaucoma congénito en uno de sus ojos. El estudio del fondo de ojo reveló que sólo la paciente # 20 presentó palidez del nervio óptico, por lo que este ojo no se incluyó en el estudio. Ambos grupos de pacientes tuvieron visión de color normal según el test de Ishihara.

En la Figura 42 se muestra el campo visual de 1 paciente del grupo CBZ y 3 pacientes del grupo VGB. Los campos visuales del grupo VGB presentaron una constricción del campo visual nasal periférico, nasal periférico y central y nasal periférico y central y temporal periférico. La Tabla VIII muestra la cuantificación de la perimetría de Humphrey de ambos ojos de los pacientes tratados con VGB. Los pacientes # 8 y 18 no fueron capaces de realizar el estudio. De los 18 pacientes restantes, dos tuvieron un campo visual normal (pacientes # 1 y 17). Los otros 16 pacientes mostraron al menos un punto no detectado dentro de los 40° para ambos ojos, en tanto que no se observaron defectos en el campo visual de los pacientes tratados con CBZ. El 45% de los ojos de pacientes tratados con VGB que mostraron alteraciones en el campo visual tuvieron una constricción en la periferia dentro de los 60° del campo visual. La constricción fue nasal en todos los casos mientras que en el 58% de los casos fue también temporal. El apareamiento de los puntos no detectados para cada ojo entre ambos ojos de cada paciente (grupo VGB) resultó en una correlación altamente significativa ($p < 0,0001$), lo que indica que la constricción fue bilateral. No se observó correlación entre los defectos en el campo visual y la duración, o la cantidad de VGB acumulada. De hecho, el campo visual del paciente # 10 que recibió VGB por 2 años fue similar al del paciente # 11 que estuvo bajo el mismo tratamiento durante 6 años. Además, los dos pacientes que presentaron un

campo visual normal habían tomado VGB durante 3 y 5 años (pacientes # 1 y 17 respectivamente).
Tampoco se observó relación entre las alteraciones visuales y el síndrome epiléptico o la duración de la epilepsia.

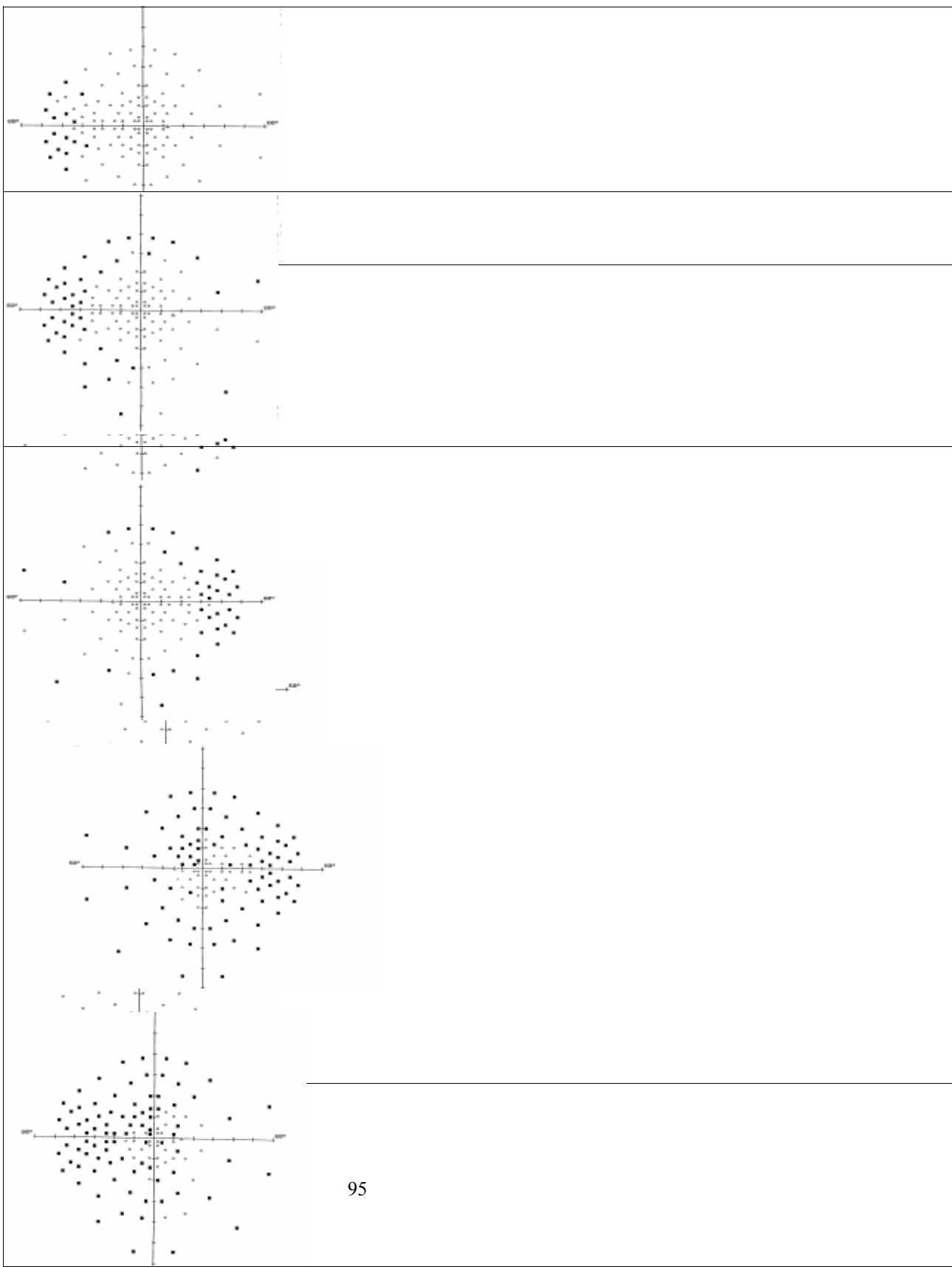


Figura 42. Campo visual de un paciente control y de tres pacientes tratados con VGB. El campo visual del paciente control (A) fue normal en tanto que los otros presentaron alteraciones evidentes. B) Se muestra una alteración nasal periférica, en C) una alteración nasal periférica y central y en D) una alteración nasal periférica y central y temporal periférica.

Tabla VIII. Cuantificación de los puntos no detectados en la perimetría de Humphrey de los pacientes tratados con VGB (del 1 al 20) o CBZ (del 21 al 35)

Paciente #		Puntos no vistos					
		en todo el campo visual (de 120)	dentro de los 30° (de 64)	dentro de los 40° (de 104)	periféricos (de 56, fuera de los 30°)	en el hemicampo nasal (de 74)	en el hemicampo temporal (de 46)
1	RE	1	1	1	0	1	0
	LE	0	0	0	0	0	0
2	RE	9	0	1	9	9	0
	LE	3	0	1	3	3	0
3	RE	22	0	9	22	21	1
	LE	20	0	7	20	17	3
4	RE	38	5	17	33	32	6
	LE	40	6	19	34	38	2
5	RE	9	0	4	9	6	3
	LE	4	1	2	3	2	2
6	RE	16	0	7	16	16	0
	LE	19	0	7	19	18	1
7	RE	16	0	4	16	15	1
	LE	9	0	1	9	9	0
9	RE	19	0	7	19	18	1
	LE	24	0	13	24	22	2
10	RE	68	13	35	55	45	23
	LE	63	9	38	54	43	20
11	RE	68	22	27	46	34	34
	LE	72	29	55	43	64	8
13	RE	54	6	28	48	43	11
	LE	55	7	30	48	44	11
14	RE	20	2	13	18	15	5
	LE	9	1	6	8	7	2
15	RE	33	10	19	23	22	11
	LE	64	18	32	46	47	17
16	RE	35	4	10	31	24	11
	LE	32	1	13	31	30	2
17	RE	1	0	0	1	1	0
	LE	2	0	0	2	2	0
18	RE	42	0	27	42	36	6
	LE	39	0	23	39	31	8
19	RE	57	6	35	51	40	17
	LE	72	25	30	47	47	25
20	RE	40	5	21	35	23	17
	LE						
21	RE	0	0	0	0	0	0
	LE	0	0	0	0	0	0
22	RE	0	0	0	0	0	0
	LE	0	0	0	0	0	0
24	RE	5	1	1	4	2	3
	LE	0	0	0	0	0	0
26	RE	0	0	0	0	0	0
	LE	3	0	0	3	0	3
27	RE	5	0	0	5	5	0

	LE	0	0	0	0	0	0
29	RE	0	0	0	0	0	0
	LE	1	1	1	0	0	0
30	RE	0	0	0	0	0	0
	LE	0	0	0	0	0	0
32	RE	2	0	0	2	0	2
	LE	1	0	0	1	0	1
33	RE	0	0	0	0	0	0
	LE	0	0	0	0	0	0
34	RE	0	0	0	0	0	0
	LE	0	0	0	0	0	0
35	RE	0	0	0	0	0	0
	LE	0	0	0	0	0	0

Los pacientes # 8, 12, 23, 25, y 31 no colaboraron con el estudio del campo visual. Se excluyó del estudio el ojo izquierdo de la paciente # 20. RE: ojo derecho LE: ojo izquierdo.

En la Figura 43 se muestra la actividad electroretinográfica para ambos ojos de dos pacientes controles y de dos pacientes tratados con VGB. De los 20 pacientes tratados con VGB el paciente # 2 no se presentó al estudio. La amplitud promedio de la onda b fue significativamente menor en el grupo VGB que en el grupo CBZ (Figura 44).

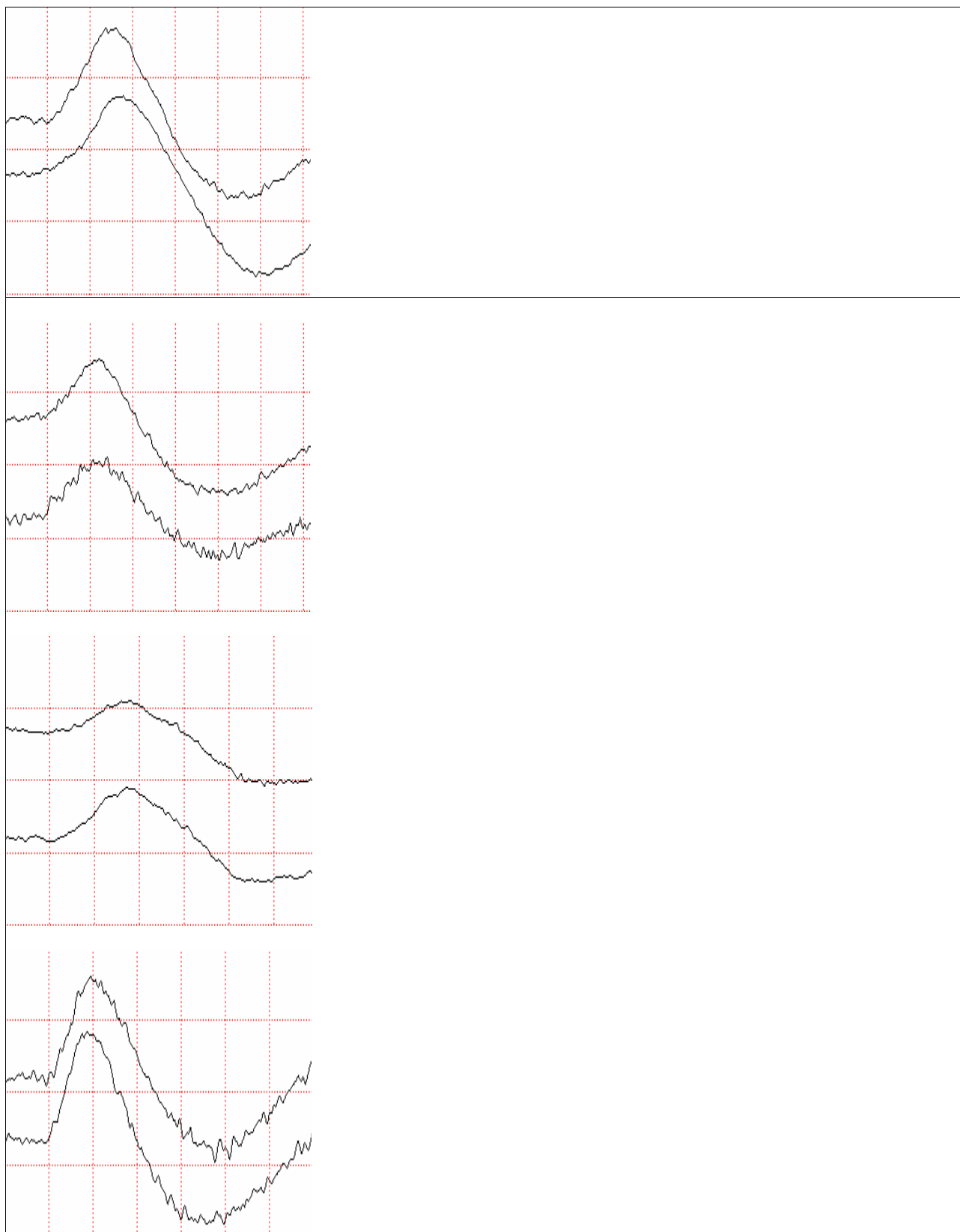


Figura 43. ERG escotópicos de dos pacientes tratados con CBZ y de dos pacientes tratados con VGB.

Figura 44. Efecto de tratamiento crónico con VGB sobre la amplitud de la onda b del ERG escotópico. El tratamiento crónico con VGB disminuyó significativamente la amplitud de la onda b del ERG con respecto a los pacientes tratados con CBZ. Se representan las medias \pm ES (n: 15 y 19 pacientes para el grupo control y VGB, respectivamente. ****p<0,01; test de Student.**

En grupo de pacientes tratados con VGB el apareamiento de la amplitud de la onda b entre el valor obtenido para el ojo derecho y para el ojo izquierdo fue significativo ($p < 0,01$) indicando la bilateralidad de la disfunción. En el 86% de los pacientes del grupo de VGB las amplitudes de las ondas b fueron menores que el límite inferior del intervalo de confianza del grupo de CBZ, definido como la amplitud promedio de la onda b \pm 3 errores estándar (media \pm 3 ES). No se observaron diferencias en la latencia de la onda b para ninguno de los grupos. Por razones metodológicas (esencialmente debido a una gran dispersión intra-grupo) se omitió el análisis de la onda a. En la Figura 45 se muestra la correlación entre el promedio de los puntos vistos para ambos ojos de cada paciente y la amplitud promedio de la onda b para ese mismo paciente.

Figura 45. Falta de correlación significativa entre el número de puntos vistos y la amplitud de la onda b del ERG escotópico en pacientes epilépticos tratados con VGB. ($r^2 = 0.017$)

La Figura 46 muestra los POEs de un paciente control y de un paciente tratado con VGB. No se observaron diferencias significativas ni en la latencia ni en la amplitud de la P100 entre ambos grupos.

010009000003780000002001c000000000040000000301080005000000b02000000005000000c020f08f10604000
 0002e0118001c00000fb021000070000000000bc0200000000102022253797374656d0008f1060000c96e0000fc5b11
 0004ee8339e0718a020c020000040000002d0100000400000020101001c000000fb029cff00000000000090010000000
 00440001254696d6573204e657720526f6d616e000000000000000000000000000000000040000002d0101000500000
 00902000000020d000000320a5a0000000100040000000000ef060f0820002d00040000002d010000030000000000

Figura 46. POEs de un paciente tratado con CBZ y de un paciente tratado con VGB.

Estos resultados avalan trabajos de otros autores que indican que el tratamiento con VGB provoca una disfunción ocular significativa. Sin embargo, aún se desconocen los mecanismos involucrados en la disfunción visual inducida por VGB. Para analizar este aspecto, resultaría de utilidad disponer de modelos animales en los que se pueda tener acceso a la retina. Para ello, se trataron hámsteres diariamente con VGB (i.p.) y se determinó la actividad electroretinográfica escotópica a distintos períodos de iniciado el tratamiento. Luego de 3 semanas de tratamiento con VGB la onda a del ERG disminuyó significativamente. A las 4 y 5 semanas de tratamiento se observó una disminución significativa en la amplitud de la onda b (Figura 47). No se observaron cambios en ninguno de estos parámetros a las 24 h post-inyección ni a las 2 semanas de tratamiento crónico (datos no mostrados)

Figura 47. Efecto del tratamiento crónico con VGB sobre la amplitud de las ondas a y b del ERG escotópico. El tratamiento con VGB disminuyó significativamente la amplitud de la onda a con respecto a los controles luego de tres semanas de tratamiento en tanto que la amplitud de la onda b disminuyó a partir de las 4 semanas. Se representan las medias \pm ES (n=10). *p<0,05; **p<0,01, test de Tukey

6. b. Desarrollo de un modelo experimental de glaucoma: Estudio de la actividad GABAérgica

Como ya se mencionara en la Introducción, previamente hemos demostrado que un hipotensor ocular de uso frecuente, la brimonidina, aumenta significativamente la actividad de hialuronidasa trabecular en el conejo (Benozzi y col., 2000). A partir de estos resultados, hemos postulado que el efecto hipotensor de la brimonidina podría estar mediado, al menos en parte, por la estimulación de esta actividad enzimática, es decir, por el aumento en el *clearance* de glicosaminoglicanos (GAGs). Si una disminución en el contenido de GAGs disminuye la PIO, parece posible que el aumento en el contenido de AH trabecular induzca el efecto opuesto. En experimentos previos se demostró que una inyección única de AH provoca una hipertensión ocular significativa respecto al ojo inyectado con vehículo que se mantuvo durante 8 días (datos no mostrados). Con el objeto de desarrollar un modelo de hipertensión ocular crónica en ratas, se inyectó AH en la cámara anterior de un ojo de cada animal y en el ojo contralateral se inyectó igual volumen de vehículo (solución fisiológica) una vez por semana durante 10 semanas. Los valores promedio de la PIO de estos animales se representan en la Figura 48. La PIO en los ojos tratados con AH alcanzó un estado estacionario que se mantuvo a lo largo de todo el tratamiento, y fue significativamente mayor que en los ojos inyectados con vehículo. La inyección de solución salina no alteró significativamente la PIO en comparación con los animales intactos (datos no mostrados). Se observó una alta consistencia inter-grupo, dado que todos los animales, sin ninguna excepción, respondieron con un aumento de la PIO luego de la inyección de AH.

Figura 48. Efecto de la inyección crónica de AH (en un ojo) y vehículo (en el ojo contralateral) sobre la PIO. La PIO de los ojos tratados crónicamente con AH fue significativamente mayor que en los ojos tratados con vehículo, en todos los intervalos estudiados. Se representan las medias \pm ES (n = 20 ojos/grupo). *p < 0,05; **p < 0,01; test de Student comparado con los valores de la PIO de los ojos inyectados con vehículo.

A continuación, se analizó el estado funcional y morfológico de las retinas de los animales tratados crónicamente con AH. Para ello, se examinó por un lado, la actividad electroretinográfica y por otro, se realizó un análisis histológico de las retinas de animales inyectados con solución fisiológica o con AH.

En la Figura 49 se representan los valores promedio de la amplitud de las ondas a y b de animales inyectados con AH o solución salina durante 6 y 10 semanas, respectivamente. No se observaron modificaciones electroretinográficas en animales tratados con AH durante 3 semanas (datos no mostrados).

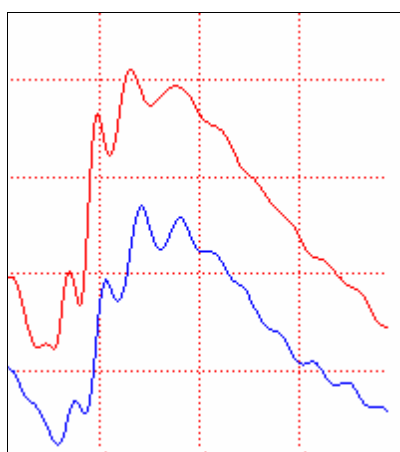
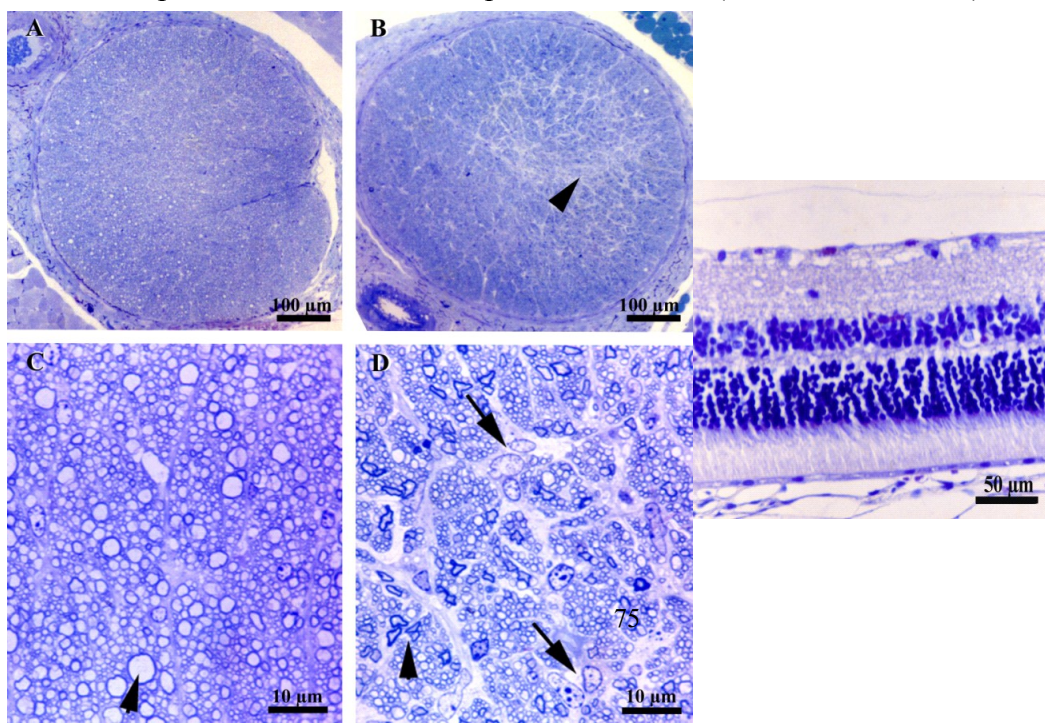


Figura 49. Efecto de la inyección crónica de AH (en un ojo) y vehículo (en el ojo contralateral) durante 6 (A) ó 10 (B) semanas sobre la amplitud de la onda a y b del ERG escotópico. En el panel de la izquierda se muestra un registro representativo y en el panel de la derecha se muestra el promedio de las amplitudes de la onda a y b para los ojos inyectados con vehículo o con AH. Se representan las medias \pm ES (n = 20 ojos/grupo). *p < 0,05; **p < 0,01; test de Student.

En los animales inyectados con AH durante 6 semanas se observó una disminución de las amplitudes de las ondas a y b del ERG escotópico comparado con los ojos inyectados con solución salina, sin cambios en las respectivas latencias. Esta disfunción electroretinográfica se acentuó luego de 10 semanas. El ERG representativo de un animal inyectado con AH o vehículo durante 6 ó 10 semanas se muestra a la derecha de cada figura.

En la siguiente serie de experimentos se analizaron los cambios histológicos en ratas con

hipertensión ocular a las 3, 6 y 10 semanas. El análisis histológico de las retinas de los animales inyectados con vehículo o AH durante 10 semanas se representa en la Figura 50 (1). Aunque el espesor de la retina total o de las CPI, CNI y la CNE no se modificó significativamente entre el grupo control y el tratado con AH (control: 132 ± 7 ; $32,2 \pm 5$; $22,2 \pm 3,5$; $37,1 \pm 3$; AH: 123 ± 12 ; $30,6 \pm 3,5$; $19,4 \pm 2,3$; $33,5 \pm 4,7$; espesores de la retina total, CPI, CNI y CNE, respectivamente) se observó una disminución significativa en el número de células de la CCG en los animales inyectados con AH durante 10 semanas respecto a los controles. El número medio/100 $\mu\text{m} \pm \text{ES}$ de células en la CCG para el grupo control fue: $8,7 \pm 0,7$, mientras que en las ojos inyectados con AH el valor fue: $5,2 \pm 0,6$ ($p < 0,01$, test de Student). A nivel del nervio óptico de los animales inyectados con AH, se observó una pérdida de la uniformidad e integridad en la tinción. Los axones de los nervios en los ojos control mantuvieron una apariencia uniforme y se observaron axones de tamaño variable. Por otro lado, en los ojos con hipertensión ocular se evidenció una pérdida significativa de axones, un aumento del espacio entre los mismos y proliferación glial. En la evaluación individual de estos axones se demostró una pérdida de la morfología circular normal con distorsión y distensión axonal (Figura 50 (2)). En la Figura 50 (3) se representa la cuantificación del número de axones de acuerdo a su tamaño ($0,2-5\mu\text{m}$) en los ojos tratados con vehículo o AH durante 10 semanas. Se observó una disminución significativa en axones de mediano y gran tamaño en los animales inyectados con AH, sin afectar los axones pequeños. No se observaron cambios similares en períodos más cortos de hipertensión ocular (datos no mostrados).



0100090000037800000002001c00000000000400000003010800050000000b0200000000
 050000000c020f08f106040000002e0118001c00000fb021000070000000000bc02000000
 000102022253797374656d0008f1060000c96e0000fc5b110004ee8339e0718a020c02000
 0040000002d01000004000000020101001c00000fb029cff000000000000900100000000
 0440001254696d6573204e657720526f6d616e0000000000000000000000000000000000
 040000002d010100050000000902000000020d000000320a5a0000000100040000000000
 ef060f0820002d000400000002d010000030000000000

Figura 50. Cortes de retina y nervio óptico de rata de ojos inyectados con AH o vehículo una vez /semana, durante de 10 semanas. 1) Se muestra un corte representativo de la retina de un ojo tratado con vehículo (A) y un corte representativo de un ojo tratado con AH (B). El número de células en la CCG fue significativamente menor en los animales tratados crónicamente con AH. 2) Se muestra un corte representativo del nervio óptico de un ojo tratado con vehículo (A y C) y un corte representativo de un ojo tratado con AH (B y D), durante el mismo período. 3) Se muestra el diámetro promedio de los axones tanto para los ojos inyectados con vehículo como con AH. El número de axones grandes y medianos fue significativamente menor en los animales tratados crónicamente con AH. Se representan las medias \pm ES (n = 8 ojos/grupo) **p < 0,01; test de Student.

Como se mencionara en la Introducción, en nuestro laboratorio recientemente demostramos un incremento significativo en las concentraciones de glutamato en el espacio sináptico luego de 3 semanas de tratamiento con AH (Moreno y col., 2005). A pesar de que existe una activa interacción glutamato/GABA a nivel retiniano, no se dispone al presente de ningún estudio que analice la actividad GABAérgica en modelos experimentales de glaucoma. Por lo tanto, se examinaron diferentes marcadores de la actividad GABAérgica a las 3 semanas de tratamiento con AH. En primer lugar, se examinó el *turnover* retiniano de GABA. Este parámetro disminuyó significativamente en los ojos tratados con AH. (Figura 51).

Figura 51. Efecto de la hipertensión ocular sobre el *turnover* de GABA. El *turnover* de GABA disminuyó significativamente en retinas de ojos tratados con AH una vez/semana durante 3 semanas, respecto a los controles inyectados con vehículo. Se representan las medias \pm ES (n = 8). **p<0,01 test de Student.

Asimismo, se analizó el efecto de la hipertensión ocular sobre la actividad de GAD. Esta actividad enzimática disminuyó significativamente a las 3 semanas de tratamiento con AH (Figura 52).

Figura 52. Efecto de la hipertensión ocular sobre la actividad de GAD. Esta actividad enzimática disminuyó significativamente en los ojos tratados con AH una vez/semana durante 3 semanas. Se representan las medias \pm ES (n = 8). **p<0,01 test de Student

A continuación, se examinó la liberación de GABA en respuesta a un estímulo de alto potasio extracelular en retinas de ratas tratadas con AH o solución fisiológica durante 3 semanas. El tratamiento con AH no modificó este parámetro (Figura 53).

Figura 53. Efecto de la hipertensión ocular sobre la liberación fraccional de [³H]-GABA. La hipertensión ocular no modificó la liberación basal ni la liberación estimulada por potasio. Se representan las medias de la liberación \pm ES (n = 8); **p<0,01 respecto al basal; test de Tukey.

Finalmente, se analizó el efecto de la hipertensión ocular sobre la captación de [³H]-GABA (Figura 54). El transporte retiniano de GABA aumentó significativamente a las 3 semanas de tratamiento con AH, respecto a los controles inyectados con vehículo.

Figura 54. Efecto de la hipertensión ocular sobre la captación de GABA en retinas de ratas inyectadas durante 3 semanas con AH. Este parámetro aumentó significativamente en los ojos tratados con AH. Se representan las medias \pm ES (n = 8). **p<0,01 test de Student.

Discusión

A. Caracterización del sistema GABAérgico en la retina del hámster dorado.

El objetivo central de este trabajo de tesis fue caracterizar el sistema GABAérgico retiniano y evaluar algunos aspectos de su relevancia funcional, tanto en condiciones normales como en dos situaciones patológicas particulares: en una población de pacientes epilépticos expuestos a un tratamiento farmacológico que modifica los niveles de este neurotransmisor y en un modelo experimental de una enfermedad ocular prevalente. Con la salvedad del estudio en los pacientes epilépticos y el modelo de glaucoma experimental, los experimentos realizados se centraron en examinar distintos aspectos del sistema GABAérgico en la retina del hámster dorado. Aunque los estudios en este modelo son relativamente más escasos que los realizados en otros modelos animales (especialmente la rata), el hámster dorado constituye una herramienta de valor indiscutible, particularmente cuando se trata de profundizar conocimientos cronobiológicos (lo que constituye uno de los objetivos de este trabajo). Esta especie ha sido extensamente utilizada como modelo en cronobiología dado que presenta ritmos biológicos robustos y fácilmente registrables, así como una marcada influencia circadiana en la fisiología del organismo *in toto* y en la fisiología retiniana en particular. Desde esta perspectiva, no resulta sorprendente que la primera evidencia experimental que avala sólidamente la presencia de un reloj circadiano endógeno en la retina de mamíferos fuera obtenida, precisamente, en el hámster dorado (Tosini y Menaker, 1996). En nuestro laboratorio iniciamos el análisis de diversos aspectos de la retina de esta especie hace ya más de diez años y al presente disponemos de una cantidad considerable de antecedentes que avala la experiencia adquirida en el estudio de este modelo animal.

Para el objetivo específico de esta Tesis y teniendo en cuenta que la liberación de GABA no había sido previamente examinada en esta especie, los primeros experimentos tuvieron como objetivo analizar el(los) mecanismo(s) de liberación de GABA en la retina del hámster dorado. En este sentido, se demostró que tanto un estímulo despolarizante inducido por altas concentraciones de K^+ extracelular, como la presencia del principal neurotransmisor retiniano, el glutamato, inducen la

liberación de GABA en forma significativa. Sin embargo, los mecanismos desencadenados por ambas señales difirieron entre sí. El efecto de la despolarización por alto K^+ resultó al menos parcialmente ($\cong 50\%$) dependiente de Ca^{2+} , en tanto que la liberación inducida por glutamato no se modificó en ausencia de este catión. Además, el reemplazo de Na^+ por Li^+ inhibió la liberación inducida por glutamato, sin modificar el efecto del alto K^+ .

Como ya se mencionara en la Introducción, la liberación de GABA ha sido objeto de una cantidad considerable de estudios y aún es un tema controversial. En la retina de pollo y en células horizontales de sapos y teleósteos, el efecto del glutamato sobre este parámetro es parcialmente dependiente de Ca^{2+} (Schwartz, 1982; Yazulla y col., 1985; Duarte y col., 1993), mientras que en células amácrinas de rata este efecto es completamente dependiente de este catión (Neal y col., 1989). Basado en estas y otras evidencias, se han propuesto dos mecanismos para la liberación de GABA en el sistema nervioso central en general y en la retina en particular. Uno de ellos, en el que la liberación involucra vesículas conteniendo el transmisor y, por lo tanto, análogamente a lo observado para otros neurotransmisores, depende de la presencia de Ca^{2+} , y otro que involucra la reversión del transportador de GABA presináptico y es dependiente de Na^+ pero no de Ca^{2+} (Nicholls, 1989; Bernath, 1992; Schwartz, 2002). Los resultados obtenidos indican la actividad de ambos mecanismos en la retina de hámster.

Aunque el uso de neurotransmisores marcados radioactivamente es una herramienta muy frecuentemente utilizada para examinar parámetros neuroquímicos, diversos aspectos meramente experimentales pueden llevar a conclusiones erróneas. Por ejemplo, una limitación considerable de este enfoque es que en este tipo de experimentos es necesario preincubar el tejido durante un tiempo variable con el ligando marcado y con ello se asume que la distribución celular de este radioligando homologa a la distribución del compuesto endógeno. Esta asunción es, en la mayoría de los casos, difícilmente comprobable. Sin embargo, estudios comparativos sugieren que el *pool* de GABA radioactivo podría ser diferente del *pool* del neurotransmisor endógeno (Yazulla y col., 1985). Por lo tanto, en forma complementaria a los estudios mencionados, se analizó el mecanismo de

liberación de GABA endógeno en la retina de hámster. Para ello, se utilizó el ensayo de radiorreceptor, una técnica con una sensibilidad adecuada para este fin. A pesar de las salvedades mencionadas, los resultados obtenidos en nuestro sistema experimental fueron esencialmente similares para el transmisor endógeno y para el radioligando. Las similitudes observadas con ambos métodos fueron: la magnitud de este parámetro (expresado en porcentaje respecto al contenido total), las características en cuanto a la dependencia de Ca^{2+} para ambos estímulos, y el hecho de que en las condiciones experimentales utilizadas, la magnitud de la respuesta inducida por el alto K^+ fue en ambos casos mayor que la inducida por glutamato. Sin embargo, en la liberación de GABA endógeno inducida por glutamato se observó un efecto inhibitorio del Ca^{2+} extracelular que no fue evidente en la liberación de ^3H -GABA. Aunque no se dispone de una hipótesis que permita explicar esta discrepancia, en células de retina de pollo en cultivo se ha demostrado que el glutamato incrementa la concentración intracelular de Ca^{2+} y que este catión disminuye la liberación de GABA (Duarte y col., 1993).

En la retina de hámster, la dependencia de Na^+ y la independencia de Ca^{2+} en la liberación de GABA inducida por glutamato sugieren que este neurotransmisor desencadena un mecanismo mediado por la reversión de un transportador de GABA. El efecto del glutamato fue mediado por un receptor de tipo no NMDA dado su bloqueo por DNQX en tanto que el APV fue inefectivo. Asimismo, el kainato, pero no el NMDA, indujo un incremento significativo de la liberación de GABA. Aunque se ha demostrado que la potencia del NMDA es mayor en un medio libre de Mg^{2+} (Zeevalk y Nicklas 1992), tampoco en ausencia de este catión se observó un efecto significativo del NMDA. La ausencia de efecto del NMDA es compatible con la independencia de Ca^{2+} en la liberación de GABA inducida por glutamato. En concordancia con estos resultados, la liberación de GABA en células amácrinas de rata es insensible a NMDA (Neal y col., 1989), aunque en retina de pollo este mecanismo es mediado tanto por receptores NMDA como por receptores no NMDA (Hofmann y Möckel, 1991). Estos resultados sugieren un perfil farmacológico diferente para los receptores de glutamato involucrados en la liberación retiniana de GABA en función de la especie.

Con el objeto de analizar la localización celular del GABA en la retina de hámster, se realizaron estudios inmunohistoquímicos usando un anticuerpo específico anti-GABA. Trabajos de otros autores demostraron que la población de células inmunorreactivas para GAD es menor que la población detectable con anticuerpos anti-GABA y/o con [³H]-GABA (Mosinger y Yazulla 1985; 1987; Hendrickson y col., 1985), lo que podría indicar que la inmunohistoquímica para GABA provee una herramienta probablemente más sensible que otros métodos para identificar células GABAérgicas.

Análogamente a las evidencias obtenidas en retinas de otros mamíferos (Agardh y col., 1987; Wässle y Chum, 1989; Freed, 1992), los resultados demuestran que las células amácrinas son la principal población celular inmunorreactiva para GABA en el hámster, aunque también se detectó una población de células inmunorreactivas en la CCG. En la retina de conejo se ha demostrado que entre el 84% y el 100% de las células amácrinas positivas para NADPH diaforasa co-expresan marca positiva para GABA (Vaney y Young, 1988). Por otro lado, se ha descrito que la retina del hámster dorado contiene dos tipos de células amácrinas positivas para NADPH diaforasa (Lau y col., 1994), las ND(g) que se caracterizan por un soma grande (diámetro promedio: 15,58 µm) y por localizarse en la CCG y otras denominadas ND(i) que poseen un soma más pequeño (diámetro promedio: 8 µm) y se localizan principalmente en la CNI. En la retina de hámster, el diámetro de las células positivas para GABA fue de 7,7 µm en células localizadas en la CNI y de 12,9 µm para las células positivas localizadas en la CCG. En base a la coexistencia de GABA y NADPH diaforasa y a la concordancia del tamaño celular, parece posible que las células inmunorreactivas para GABA localizadas en la CCG de la retina de hámster corresponden a células amácrinas desplazadas. La identificación definitiva de estas células mediante el uso de marcadores específicos será objeto de estudio en un futuro próximo.

Tanto a nivel morfológico como funcional, las células amácrinas constituyen, probablemente, el tipo celular retiniano más complejo. Se han descrito más de 20 tipos morfológicamente distintos de células amácrinas que utilizan una gran variedad de neurotransmisores como dopamina,

acetilcolina, serotonina, óxido nítrico, glicina y distintos neuropéptidos, además de GABA (Vigh y col., 2000). Por lo tanto, no es sorprendente que las funciones de las células amácrinas sean también complejas. Algunas de estas células funcionan como células horizontales e intervienen en el procesamiento de aferencias antagónicas procedentes de las células bipolares que constituyen la periferia del campo receptivo de la célula ganglionar y otras están involucradas en el análisis de la información visual vinculada a la dirección del movimiento. El subtipo de células identificadas como GABAérgicas en el hámster podría participar en ambos tipos de funciones. De hecho, se ha demostrado que células amácrinas GABAérgicas en retinas de peces y conejos participan en el establecimiento de los campos receptivos (Marc y Liu 2000; Bloomfield y Xin, 2000; Zhang y col., 2002). Asimismo, en la retina de conejo se ha demostrado que determinadas células ganglionares son direccionalmente selectivas, o sea, responden a un estímulo que por ejemplo se mueve de izquierda a derecha, pero son refractarias al movimiento inverso. En presencia de un bloqueante del canal de cloruro asociado a receptores GABAérgicos, la picrotoxina, esta sensibilidad direccional desaparece y la célula ganglionar responde de la misma manera a un estímulo que se mueve en cualquier dirección. De esta forma, las células amácrinas GABAérgicas proveen a la retina de una característica funcional clave: la capacidad de detectar la dirección de movimientos, lo que sin dudas representa un gran beneficio evolutivo (Gottlieb, 1988).

El estudio inmunohistoquímico reveló, además, algunos somas inmunomarcados en la zona externa de la CNI con morfología compatible con la de células horizontales. El análisis por microscopía electrónica demostró la presencia de inmunoprecipitados en los somas de las células amácrinas, amácrinas desplazadas y en el citoplasma de células de la zona externa de la CNI. Si bien las células de Müller son las células gliales de la retina principalmente responsables de la recaptación del GABA liberado al espacio sináptico, en nuestras condiciones no se observó marca evidente en estas células. Aunque no se dispone de una explicación concluyente para ello, es posible que luego de ser recaptado por un transportador de alta afinidad, el GABA se degrade rápidamente en estas células, en forma similar a lo descrito para el glutamato (Brew y Attwell 1987; Marc y col., 1990).

El análisis ultraestructural de los terminales inmunorreactivos observados en la CPI demostró la presencia de depósitos de DAB en el compartimiento citosólico con alta concentración en la superficie citoplasmática de organelas y vesículas. Esta distribución es similar a la descrita por Somogyi y col. (1985) para el GABA en el sistema nervioso central de gatos y ratas y es característica de la localización central de péptidos neuroactivos (Pickel y col., 1977) y serotonina (Maley y Elde, 1982; Pasik y col., 1982).

La presencia de GABA en un *pool* no vesicular podría correlacionarse con la liberación de GABA independiente de Ca^{2+} , en tanto que la señal positiva dentro de vesículas en los terminales de la CNI podría constituir el sustrato anatómico para la liberación de GABA dependiente del catión. En este último caso, se detectaron vesículas conteniendo GABA con *core* denso por microscopía electrónica, en forma similar a lo descrito en otros sistemas (Somogyi y col., 1985).

En suma, estos resultados demuestran que los dos mecanismos de liberación de GABA descritos en otros sistemas podrían ser operativos en la retina de hámster. La despolarización (inducida en este caso por altas concentraciones de K^+ extracelular) podría por sí misma desencadenar ambos mecanismos, en tanto que el glutamato parece inducir sólo el componente que involucra la reversión del transportador. No resulta sencillo analizar la relevancia fisiológica de cada uno de estos sistemas. Si bien el glutamato podría considerarse la señal fisiológica retiniana, diversos mecanismos tónicos y/ o fásicos no identificados en este trabajo podrían provocar la despolarización de células que contienen GABA y con ello remedar el estímulo inducido experimentalmente. Dado que el alto K^+ pone en funcionamiento ambos mecanismos y resultó más efectivo, se decidió utilizar este estímulo en los experimentos que se discutirán más adelante y que tuvieron por objeto analizar la liberación de GABA en distintas condiciones experimentales.

Sobre la base de los antecedentes que se mencionaron en la Introducción, la siguiente serie de experimentos tuvo por objeto el estudio del efecto del GABA sobre la síntesis de melatonina en la retina del hámster dorado. En trabajos previos de nuestro laboratorio, hemos demostrado que la retina del hámster es un sitio de síntesis activa de melatonina, cuyos niveles fluctúan

significativamente a lo largo del ciclo de luz-oscuridad, con valores máximos durante la noche tardía (Faillace y col., 1994). El contenido retiniano de melatonina disminuye luego de la exposición de hámsteres a luz durante la noche y aumenta por exposición a oscuridad durante el día (Faillace y col., 1994). Resultados similares se obtuvieron en retinas de hámsteres en condiciones aisladas (Faillace y col., 1995). Este conjunto de evidencias demuestra el origen local de la melatonina retiniana y su regulación por la señal luminosa en este modelo experimental. Sin embargo, los mecanismos regulatorios, así como los mediadores químicos de la señal fótica que podrían afectar este proceso biosintético no han sido completamente elucidados.

Múltiples evidencias experimentales demuestran que la dopamina es un regulador clave de la síntesis de melatonina en la retina de la mayoría de las especies estudiadas. Asimismo, se ha demostrado que la luz aumenta la síntesis, la liberación y el metabolismo de la dopamina en la retina de diversas especies (Brainard y Morgan 1987; Godley y Wurtman, 1988). Este conjunto de evidencias ha llevado a postular que la dopamina retiniana está involucrada en la acción inhibitoria de la luz sobre la producción del metoxiindol. En nuestro laboratorio hemos demostrado que en la retina de hámster, la dopamina, cuyo *turnover* es mayor en la fase de luz que en la de oscuridad, disminuye significativamente los niveles de melatonina a través de receptores dopaminérgicos de tipo D₄/D₂ (Jaliffa y col., 2000). Habiéndose identificado una señal presumiblemente responsable de la inhibición por luz en la producción de melatonina, el siguiente paso fue la búsqueda de un mensajero activo durante la noche y estimulador de este proceso biosintético. Dado que diversas evidencias sugieren que el GABA podría constituir una señal intrarretiniana de adaptación a la oscuridad (Yazulla, 1986; Pierce y Besharse, 1988), se planteó la posibilidad de la participación de este neurotransmisor en este mecanismo. Los resultados obtenidos indican que el GABA incrementó la producción de melatonina en retinas mantenidas *in vitro* durante 8 h en condiciones de luz. Este efecto fue mediado a través de receptores GABA_A, puesto que fue revertido por un antagonista específico, la bicuculina, pero no por el 2-hidroxisaclofen (antagonista de tipo GABA_B). Asimismo, el muscimol, agonista específico GABA_A, pero no el baclofen (agonista B específico),

reprodujo el efecto GABAérgico. Estos resultados concuerdan con la estimulación *in vitro* de la NAT inducida por agonistas GABAérgicos en la retina de *Xenopus* (Boatright y Iuvone, 1989 a), y con el efecto de la administración intravítrea y sistémica de muscimol sobre la actividad de esta enzima en la retina de pollo (Kazula y col., 1993). Sin embargo, mientras que en la retina de *Xenopus*, el efecto de los agonistas GABAérgicos requiere la adición de inhibidores de la fosfodiesterasa y en la retina de pollo el muscimol es inefectivo en cultivos de células retinianas, en la retina de hámster, el GABA *per se* aumentó significativamente el contenido de melatonina *in vitro*. Se ha identificado la presencia de receptores GABA_A tanto a nivel de los fotorreceptores, como en las células amácrinas y bipolares de la retina (Lam y col., 1978; Murakami y col., 1982a, 1982b; Kaneko y Tachibana, 1986; Wu, 1991; Qiang y Dowling, 1994). Otras evidencias indican que el baclofen no afecta la respuesta de las células bipolares en mamíferos, y en las células ganglionares sólo se han observado conductancias características de los canales asociados a los receptores GABA_A (Lipton, 1989; Yeh y col., 1990). Sin embargo, en la retina de *Xenopus* se ha demostrado que tanto agonistas GABAérgicos de tipo A como de tipo B, administrados en la fase de luz, incrementan la actividad de NAT (Cahill y col., 1991).

Dado que en el presente estudio el efecto del GABA sobre la síntesis de melatonina fue analizado en retinas enteras, no es posible determinar la localización del fenómeno descrito. Sin embargo, tomando en cuenta que los fotorreceptores son el tipo celular más abundante en la retina de hámster junto con el vasto número de evidencias que demuestran que los fotorreceptores son el sitio más probable para la síntesis de melatonina (Iuvone y col., 1991; Wiechmann, 1996), parece posible que el efecto del GABA ocurra en este tipo celular. La presencia de receptores GABA_A en los fotorreceptores (Yang, 2004) podría constituir una evidencia a favor de esta hipótesis aunque formalmente no puede descartarse la participación de otros tipos celulares retinianos.

Teniendo en cuenta el efecto estimulador del GABA exógeno sobre la producción de melatonina en la retina en condiciones de luz, se consideró la posibilidad de que la activación del sistema GABAérgico participara en el aumento de los niveles de este metoxiindol inducido por la

oscuridad. Los resultados obtenidos indican que el efecto estimulador de la oscuridad es disminuido en presencia de bicuculina. En concordancia con estos resultados se ha demostrado que la picrotoxina inhibe el incremento nocturno de la actividad de NAT en la retina de aves (Boatright y Iuvone, 1989a).

Una evidencia adicional en favor del rol del GABA como mediador del estímulo inducido por la oscuridad se obtendría al demostrar un aumento de la actividad GABAérgica en estas condiciones. Dado que la determinación del contenido de un neurotransmisor es a menudo un indicador pobre de la actividad neural, se determinó el *turnover* de GABA (como una mejor aproximación a la evaluación de la actividad GABAérgica) en animales sacrificados a mediodía o a medianoche. Además, en particular en el caso del GABA, la determinación de los valores del contenido queda adicionalmente invalidada dado que pocos minutos después de la muerte se produce un aumento en este parámetro debido a la rápida inhibición de la GABA transaminasa por anoxia, sin que se altere la actividad de GAD (Van der Heyden y col., 1978). Por lo tanto, se evaluó la acumulación de GABA luego de la inhibición de su degradación (por la administración de VGB, 1 h antes del sacrificio) y luego de la inhibición de la GAD por administración de ácido 3-mercaptopropiónico 2,5 min antes del sacrificio. En estas condiciones, el *turnover* de GABA retiniano fue significativamente mayor a medianoche que a mediodía. Asimismo, los niveles de estado-estacionario de GABA fueron mayores a las 24.00 h que a las 12.00 h. En conjunto, estos resultados sugieren que el GABA podría ser parte del sistema de señales a través del cual la oscuridad activa el sistema biosintético de melatonina en la retina del hámster dorado. En particular, dos líneas de evidencia avalan esta hipótesis: 1) la bicuculina, que no tuvo efecto *per se* en condiciones de luz, inhibió significativamente la estimulación inducida por la oscuridad sobre el contenido de melatonina, lo que apoya la participación del GABA endógeno en este proceso y 2) tanto las concentraciones de estado-estacionario como el *turnover* de GABA fueron significativamente mayores durante la fase de oscuridad que durante la fase de luz. Además, los efectos del GABA y de la oscuridad no fueron aditivos.

Como se mencionara en la Introducción, en la retina de diversas especies se ha postulado que el efecto del GABA podría ser indirecto y mediado a través de la inhibición de la liberación de dopamina, es decir liberando la maquinaria biosintética de melatonina de la inhibición dopaminérgica tónica en condiciones de luz. Sin embargo, dado que la clozapina, un antagonista dopaminérgico de tipo D_4/D_2 no revirtió el efecto inhibitorio de la bicuculina sobre el contenido de melatonina en retinas expuestas a oscuridad, parece poco probable que su efecto fuera mera consecuencia de bloquear la supresión de la liberación de dopamina por una actividad GABAérgica tónica.

La complejidad de la neurotransmisión en la retina de mamíferos es comparable con la del resto del sistema nervioso central. Sin embargo, la dopamina y el GABA han sido los neurotransmisores más estudiados en relación a la respuesta a la luz (Remé y col., 1991; Kazula y col., 1993). Un amplio conjunto de evidencias propias y de otros autores demuestran que la dopamina retiniana transduce la señal de luz. Los resultados obtenidos avalan la hipótesis de que el GABA, en forma directa o indirecta, podría desempeñar un rol relevante en la transducción de la “señal de oscuridad” a nivel retiniano.

Además de la regulación por la señal luminosa, la síntesis de melatonina en la retina de hámster es controlada por un reloj circadiano endógeno local (Tosini y Menaker, 1996). En este sentido se ha demostrado que los niveles de melatonina en retinas de hámster en cultivo oscilan a lo largo del ciclo de 24 h, aún en condiciones de oscuridad constante (Tosini y Menaker, 1996). Como ya se mencionó, el reloj “maestro” del sistema circadiano se localiza en los NSQ, estructura que controla la génesis de los ritmos de una gran variedad de funciones biológicas. Existen algunos indicios relevantes en cuanto a cierta similitud en la organización funcional de la retina y los NSQ. En particular, mientras que el GABA es el principal neurotransmisor inhibitorio retiniano, se ha demostrado que todas las neuronas de los NSQ contienen GABA (Moore y Speh, 1993). Asimismo, se han demostrado ritmos circadianos en el contenido de GABA y en la actividad de GAD en los NSQ (Aguilar Roblero y col., 1993). Además de la retina y los NSQ, las neuronas GABAérgicas

cumplen un rol relevante en otras componentes del sistema circadiano como el haz intergeniculado y el complejo geniculado talámico lateral (Takatsuji y Tohyama, 1989; Moore y Card, 1994). Basado en esta distribución clave, se ha propuesto que el GABA es el principal neurotransmisor del sistema circadiano (Moore y Speh, 1993, Cardinali y Golombek, 1998). Los resultados obtenidos sugieren que el sistema GABAérgico retiniano puede mediar la acción del oscilador local sobre la síntesis de melatonina. De acuerdo a esta hipótesis, el reloj intrarretiniano podría regular los niveles de melatonina aumentando o disminuyendo la actividad GABAérgica en horarios específicos. Una condición necesaria (aunque no suficiente) para probar esta hipótesis sería demostrar que el sistema GABAérgico oscila significativamente tanto a lo largo del ciclo de luz-oscuridad, como en condiciones de iluminación constante. Por lo tanto, si bien el *turnover* de GABA y la concentración de estado-estacionario del neurotransmisor fue significativamente mayor a las 24.00 h que a las 12.00 h, se consideró de interés analizar con más detalle el curso temporal de éstos y otros parámetros GABAérgicos retinianos.

Los resultados obtenidos indican que el *turnover* de GABA varió en forma significativa en función del ciclo de 24 h, con valores máximos próximos al apagado de las luces (a las 20.30 h). El incremento observado precedió en al menos 4 horas al máximo observado en el contenido de melatonina retiniana, que ocurre entre las 04.00 y las 06.00 h (Faillace y col., 1994). En concordancia con estos resultados, se demostró que el *turnover* de GABA en corteza cerebral, cerebelo, hipotálamo y glándula pineal de hámsteres expuestos al mismo fotoperíodo que el utilizado en este trabajo, también varía a lo largo del ciclo de luz-oscuridad con una tendencia similar a valores máximos en la primera mitad de la noche (Kanterewicz y col., 1993). Dado que la determinación del *turnover* de GABA se realizó luego del bloqueo de su degradación, su síntesis constituye un blanco posible para las modificaciones diarias observadas. En concordancia con ello, la $V_{máx}$ de la actividad de GAD en la retina de hámster fue significativamente mayor a medianoche que a mediodía, sin cambios en el K_m .

Es altamente probable que el aumento de la síntesis de GABA en la presinapsis durante la fase

nocturna trascienda al espacio sináptico, dado que también la liberación de este neurotransmisor inducida por alto K^+ fue significativamente mayor en la fase nocturna que en la diurna. Por otra parte, el *binding* específico de GABA varió significativamente en la retina de hámster con máximos durante el día. Se ha descrito previamente que en el cerebro de rata el *binding* de $[^3H]$ -GABA a receptores de tipo $GABA_A$ y de $[^3H]$ -flunitrazepam a receptores de benzodiazepinas varía significativamente en afinidad y en número total de sitios a lo largo del ciclo de luz-oscuridad con máximos nocturnos y diurnos respectivamente (Acuña-Castroviejo y col., 1986a; 1986b). Asimismo, se ha descrito un pico nocturno en el influjo de $[^{36}Cl]^-$ inducido por GABA en sinaptoneurosomas de cerebro de hámster (Kanterewicz y col., 1995). Los resultados obtenidos indican que en la retina de hámster existe una relación inversa entre el *turnover* de GABA y su unión a receptores específicos. En este contexto, es posible plantear la existencia de mecanismos de subsensibilidad mediados por el propio ligando. Dado que las membranas utilizadas en todos los intervalos para la determinación del *binding* fueron lavadas exhaustivamente, es poco probable que los cambios observados se deban a variaciones en la ocupación del receptor por GABA endógeno. De hecho, los cambios diarios observados parecen correlacionarse con una variación en la concentración total de receptores, como lo indica la mayor $B_{máx}$ a las 12.00 h que a las 24.00 h, sin cambios en el K_d .

En conjunto, estos resultados indican que la actividad del sistema GABAérgico, es decir, el contenido del neurotransmisor, su *turnover*, la actividad de GAD, la liberación y la unión a receptores específicos en la retina del hámster varían significativamente en función de la hora del día. Además, estos resultados podrían explicar la sensibilidad diferencial de la síntesis de melatonina al GABA exógeno. En oscuridad, la actividad endógena GABAérgica es mayor y coherentemente con ello, el GABA exógeno es inefectivo y la bicuculina tiene efecto *per se* (probablemente por el bloqueo del GABA endógeno). En condiciones de luz, en cambio, el *turnover* de GABA y su liberación disminuyen, aumenta la cantidad de receptores GABAérgicos y con ello se hace evidente el efecto del GABA exógeno. Además, en estas condiciones la bicuculina

carece de efecto *per se* aunque revierte la estimulación en la síntesis de melatonina inducida por GABA.

Un ritmo diario en la retina puede ser controlado por un oscilador circadiano endógeno, por respuesta directa a la luz o por una combinación de ambos mecanismos. El control circadiano endógeno de un proceso rítmico debe ser demostrado por su persistencia en condiciones constantes. Para examinar este aspecto, se analizaron los mismos parámetros GABAérgicos en animales mantenidos en condiciones de libre curso (oscuridad constante) durante 48 h y luego sacrificados a lo largo del ciclo de 24 h. En estas condiciones, tanto el *turnover* de GABA como su unión a receptores específicos variaron en forma significativa en función de la hora del día, con máximos relativos durante la noche subjetiva y el día subjetivo, respectivamente. La liberación de GABA inducida por despolarización también varió circadianamente siendo mayor durante la noche que durante el día subjetivo. Estos resultados indican que la actividad del sistema GABAérgico en la retina del hámster podría estar controlada por un reloj circadiano endógeno. Una prueba adicional a favor de esta hipótesis es que el *turnover* de GABA aumentó y su unión específica disminuyó antes del inicio de la fase de oscuridad. En este sentido, si bien no puede descartarse que la iluminación ambiental afecte la neurotransmisión GABAérgica retiniana, el ciclo de luz-oscuridad no parece necesario para la generación de estos ritmos. En vista de este conjunto de resultados, es posible que un reloj circadiano intraocular regule el ritmo de biosíntesis de melatonina a través de cambios primarios en la actividad GABAérgica local. Es altamente probable que en la retina ocurran interacciones de *feedback* complejas, y por lo tanto, no es sencillo obtener conclusiones definitivas respecto a la relación de causalidad entre los ritmos. Además, si bien se ha descrito la presencia de un reloj circadiano local en la retina del hámster, la posibilidad de que los ritmos retinianos del GABA estén controlados por el NSQ, no puede descartarse por ahora en forma concluyente. Sin embargo, los resultados de Tosini y Menaker (1996) en cuanto a la persistencia de un ritmo de melatonina en retinas aisladas avalan la hipótesis de que los ritmos GABAérgicos retinianos podrían responder a un oscilador endógeno local.

Los resultados hasta aquí discutidos demuestran que el sistema GABAérgico retiniano, cuya actividad responde a un reloj circadiano endógeno (de origen local o hipotalámico) regula los niveles locales de melatonina, la que a su vez también constituye una señal retiniana rítmica. Para profundizar en la complejidad de esta interacción se consideró la posibilidad de que la melatonina, a su vez, pudiera modular la actividad GABAérgica retiniana. En este sentido, trabajos previos de nuestro laboratorio indican que en la rata, la melatonina aumenta el *turnover* de GABA en la corteza cerebral, el hipotálamo y la glándula pineal (Rosenstein y Cardinali, 1986). Asimismo, se ha demostrado que este metoxiindol regula la actividad de GAD y el influjo de Cl⁻ en el hipotálamo de rata (Rosenstein y col., 1989). Estas evidencias, junto con otras obtenidas por otros autores han llevado a postular al sistema GABAérgico como un *target* primario de la acción central de la melatonina (Rosenstein y Cardinali, 1990). Sobre la base de estos antecedentes y teniendo en cuenta la coexistencia de melatonina y GABA en la retina del hámster, así como la relevancia funcional de ambos sistemas en la fisiología retiniana, se examinó la influencia de la melatonina sobre la actividad GABAérgica en esta estructura. Los resultados obtenidos indican que la inyección intravítrea de melatonina aumentó significativamente el *turnover* de GABA y la actividad de GAD en la retina de hámster. El rango de concentración efectiva en la inducción de estos efectos es compatible con un mecanismo mediado por receptores específicos de melatonina. Se ha demostrado la presencia de receptores para melatonina en la retina de diversas especies, incluido el hámster dorado (Dubocovich y Takahashi, 1987; Reppert y col., 1995, Faillace y col., 1995, Rosenstein y Dubocovich 2001). En células amácrinas de la retina de cobayo, el receptor de melatonina de tipo ML1 co-localiza con GABA (Fujieda y col., 2000). Por otra parte, se ha demostrado que la melatonina puede modular la respuesta GABAérgica en células bipolares y amácrinas de carpa en cultivo (Li y col., 2001) y se ha sugerido que en la retina de *Xenopus* la melatonina podría incrementar el efecto inhibitorio GABAérgico a través de un receptor GABA_A (Boatright y col., 1994). El efecto de la melatonina como activador del sistema GABAérgico no se restringió a la pre-sinapsis, ya que este metoxiindol también incrementó el influjo de cloruro inducido por GABA.

Aún no se conocen los mecanismos involucrados en estos efectos potenciadores de la melatonina sobre el sistema GABAérgico retiniano. Sin embargo, teniendo en cuenta el efecto estimulador del GABA sobre la síntesis retiniana de melatonina, se puede sugerir la existencia de un mecanismo de *feedback* positivo entre el sistema GABAérgico y la melatonina en la retina de hámster dorado. Además, teniendo en cuenta que tanto la melatonina como el GABA han sido relacionados con procesos retinianos característicos de la fase de oscuridad, es posible que este “diálogo fluido” entre ambos sistemas de señales, contribuya a la adaptación de la retina (y con ello al resto del organismo) a la fase nocturna.

Dada la relevancia funcional del sistema GABAérgico en la retina y en los NSQ, dos estructuras que aparentemente comparten la capacidad de oscilar circadianamente en forma autónoma aun en condiciones aisladas, no resultaría completamente sorprendente la posibilidad de que el GABA retiniano pueda también participar en la información proveniente de la retina que llega a los NSQ. A través de manipulaciones farmacológicas del sistema GABAérgico a nivel periférico, se han obtenido evidencias que sugieren que este sistema está involucrado en los mecanismos de cambio de fase inducidos por pulsos de luz. La administración intraperitoneal de una benzodiazepina que activa al receptor GABA_A, disminuye los avances de fase inducidos por luz a CT 18, en tanto que cuando se administra en este horario sin pulso de luz, provoca un pequeño retraso de fase (Ralph y Menaker, 1986). Otros autores han demostrado que la DHEAS, un esteroide neuroactivo que modula al receptor de GABA_A, inhibe los adelantos de fase cuando se inyecta 15 min antes de administrar un pulso de luz a CT 18 (Pinto y Golombek, 1999), aunque la administración i.p. de VGB no provoca cambios en los adelantos de fase inducidos por luz a CT 18 (Golombek y Ralph, 1994). Estas evidencias podrían sugerir la participación del sistema GABAérgico en los mecanismos de cambios de fase, aunque dado que las manipulaciones farmacológicas se realizaron a nivel sistémico, no es posible discriminar la localización del sistema GABAérgico que participa en estos efectos. Sin embargo, se ha demostrado que la microinyección de agonistas del receptor GABA_A directamente en los NSQ inhibe los avances de fase en respuesta a un flash de luz a CT 19

(Gillespie y col., 1997).

Con el objeto de analizar si el sistema GABAérgico retiniano podría afectar la transmisión de la información fótica hacia los NSQ, se decidió examinar el efecto de la manipulación de este sistema sobre la actividad circadiana. Un antecedente directo para este estudio fue la demostración de que la inyección intravítrea de bicuculina disminuye significativamente la magnitud del retraso de fase inducido por luz (es decir cuando se aplicó el pulso a la noche subjetiva temprana, CT 13.50), pero no la del avance de fase (cuando el pulso fue a CT 20) (Della Maggiore y col., 1999). Los resultados obtenidos en esta Tesis demuestran que la inyección intravítrea de VGB disminuye la magnitud del adelanto de fase (con pulso de luz a CT 18). A la luz de las evidencias ya discutidas sobre la actividad rítmica circadiana, ambos resultados admiten, quizás, una interpretación en común. La administración de bicuculina resulta específicamente efectiva cuando los niveles endógenos retinianos de GABA son relativamente altos, mientras que el efecto de la VGB lo es a la noche subjetiva tardía, es decir cuando los niveles de GABA retiniano son relativamente bajos. Tomados en conjunto, ambos resultados avalan el papel del GABA retiniano en el sistema circadiano y sugieren que la alteración del ritmo GABAérgico en la retina puede trascender a la fisiología circadiana. Es altamente probable que exista una íntima relación entre el oscilador ocular y el reloj de los NSQ, de manera de ajustar con precisión la ritmicidad circadiana con los ciclos ambientales. En este sentido, un ritmo originado en la retina podría actuar de manera de “preparar” a los ojos para las señales de luz periódicas “que esperan” los NSQ, actuando como una compuerta dinámica de la información luminosa disponible para los núcleos hipotalámicos.

Diversos aspectos de la función retiniana, desde la transcripción génica hasta complejas interacciones intercelulares son regulados por osciladores circadianos (Korenbrot y Fernald, 1989; Remé y col., 1991; Cahill y Besharse, 1993). Aunque se ha dedicado mucha atención al estudio de la regulación rítmica retiniana, el conocimiento de la localización y la naturaleza del putativo reloj retiniano es aún incompleto. Los resultados obtenidos avalan la posibilidad de que el sistema GABAérgico retiniano, como componente del sistema generador de ritmos oculares, podría estar

involucrado en la respuesta a la luz y en la ritmicidad circadiana, como parte integral de los mecanismos que subyacen a la regulación temporal de la fisiología retiniana.

Un conjunto de evidencias sólidas señala a los NEs como los moduladores endógenos más conspicuos del sistema GABAérgico. Sin embargo, a pesar del papel significativo del GABA en la fisiología retiniana, el efecto de los NEs sobre este sistema ha sido escasamente examinado. Los resultados presentados indican que en el hámster, los NEs afectan significativamente la neuroquímica retiniana y la actividad electroretinográfica.

Los NEs son sintetizados *de novo* en el sistema nervioso central (incluyendo la retina), y pueden alterar la excitabilidad neuronal. Los NEs modulan positiva o negativamente la función de una superfamilia de canales iónicos dependientes de ligando, particularmente los receptores GABA_A. Como para otros moduladores alostéricos, se ha sugerido la presencia de una región específica del receptor a la que se unen los NEs. Dependiendo de la combinación de subunidades que conforman el receptor (Puia y col., 1993; Belelli y col., 2002; Sullivan y Moenter 2003) y/o del estado de fosforilación (Brussaard y Koksma 2003; Lambert y col., 2003), los NEs modulan la corriente que fluye a través del receptor GABA_A cuando el GABA se une a su receptor. En células que responden a NEs, la THDOC potencia la actividad del receptor de GABA_A en presencia de GABA (Majewska y Schwartz, 1987; Reddy, 2003), mientras que la PS inhibe la actividad del receptor, disminuyendo el efecto del GABA (Majewska y col., 1986; Teschemacher y col., 1997). Los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis indican que en la retina de hámster tanto la PS como la THDOC pueden modular la postsinapsis GABAérgica, dado que, como en otras estructuras, la PS disminuye y la THDOC aumenta el influjo de [³⁶Cl]⁻ inducido por GABA. Si bien es un hecho establecido que los NEs tienen la capacidad de modular las corrientes de cloruro a través del receptor GABAérgico, las concentraciones efectivas parecen ser altamente dependientes del tipo de neurona. Por ejemplo, mientras que concentraciones bajas (en el rango nM) de NEs son eficaces en neuronas de hipocampo, en células granulares cerebelosas y en neuronas de Purkinje (Cooper y col. 1999; Vicini y col., 2002; Harney y col., 2003), en el hipotálamo (Brussaard y col., 1997, Fancsik y col., 2000;

Koksma y col., 2003) y en la retina de hámster sólo concentraciones micromolares de NEs son efectivas. La sensibilidad diferencial a los NEs para desencadenar una respuesta postsináptica en los diferentes tejidos podría explicarse por la heterogeneidad en el patrón de expresión de las subunidades o el patrón local de fosforilación del receptor GABA_A.

Además del efecto sobre la postsinapsis GABAérgica, se ha demostrado que la PS antagoniza la corriente de cloruro activada por glicina (Wu y col., 1990), potencia las corrientes de Ca²⁺ a través del receptor NMDA en neuronas de médula espinal (Wu y col., 1991), e incrementa el efecto proconvulsivante del NMDA en ratones (Maione y col., 1992). Más recientemente, se demostró que la PS afecta también la presinapsis glutamatérgica (Meyer y col., 2002; Mayo y col., 2003) y aumenta la liberación basal de dopamina en el núcleo accumbens de rata (Barrot y col., 1999). Los resultados presentados constituyen la primera demostración experimental de un efecto positivo de la PS y de un efecto negativo de la THDOC sobre la liberación de GABA inducida por alto K⁺. En contraste, Teschemacher y col. (1997) demostraron que la PS en concentraciones micromolares, reduce la liberación basal de GABA en cultivos de neuronas de hipocampo. En la retina y en el hipotálamo de hámster, la PS y la THDOC no afectaron la liberación basal de GABA sino que modularon significativamente la liberación del neurotransmisor inducida por despolarización. El mecanismo involucrado en los efectos presinápticos de la PS y la THDOC aún no ha sido establecido. Sin embargo, no parece posible un mecanismo que implique la regulación sobre la expresión genética ya que estos efectos fueron evidentes luego de un período de incubación relativamente corto (20 minutos), mucho menor que lo esperable para una respuesta mediada por un receptor “clásico” de hormonas esteroideas. Otros autores han demostrado que la PS tiene la capacidad de modular receptores de tipo NMDA (Mathis y col., 1994; Shibuya y col., 2003), aunque parece poco probable que este efecto pudiera explicar el aumento en la liberación de GABA, puesto que en la retina de hámster este parámetro no es afectado por NMDA (Tabla III).

Se ha descrito la presencia de autorreceptores GABAérgicos capaces de modular la liberación de GABA en la corteza cerebral y la médula espinal (Bonanno y Raiteri, 1993), en sustancia negra

(Floran y col., 1988), y en la eminencia media (Anderson y Mitchell, 1985), entre otras estructuras. Sin embargo, la caracterización de los autorreceptores de GABA aún no es clara. Diferentes experimentos *in vitro* indican que el muscimol inhibe la liberación de GABA (Arbilla y col., 1979; Brennan y col., 1981), mientras que en otros experimentos este agonista no tuvo efecto. Además, se ha demostrado que el baclofen suprime la liberación de GABA (Waldmeier y col., 1988; Bonanno y col. 1989). En la retina de hámster, el efecto antagónico de la PS y la THDOC sugiere la presencia de receptores GABA_A localizados en el terminal presináptico, es decir autorreceptores capaces de mediar el efecto de los NEs. De esta forma, la PS, como modulador negativo del receptor GABA_A actuando a nivel de este presunto autorreceptor podría contribuir a una menor hiperpolarización del terminal y con ello facilitar la liberación de GABA. Por el contrario, la THDOC como modulador positivo, podría incrementar la hiperpolarización del terminal presináptico y consecuentemente disminuir la liberación del transmisor. En este sentido, se ha demostrado que diversas benzodiazepinas y el pentobarbital (moduladores alostéricos clásicos de receptores GABA_A) potencian la inhibición inducida por muscimol de la liberación de GABA inducida por alto K⁺ en el sistema nervioso entérico de cobayos (Taniyama y col., 1988). En la retina, la presencia de receptores GABA_A en las células amácrinas, las principales células GABAérgicas en el hámster, podría ser el *target* para este mecanismo autorregulatorio. Además, dado que el muscimol reduce la liberación de [³H]-GABA dependiente de Ca²⁺ inducida por alto K⁺ (Taniyama y col., 1988), no es sorprendente que los efectos de la PS y la THDOC sobre este parámetro fueran dependientes de este catión. Basado en estos resultados, es tentador especular que en este sistema, los efectos de los NEs sobre los putativos autorreceptores y sobre los receptores postsinápticos son similares. Estos efectos parecen no ser completamente específicos de tejido, puesto que se observó un perfil similar también en el hipotálamo de hámster.

Como ocurre con otros sistemas de neurotransmisión, el engrama de la señal GABAérgica está determinado principalmente por mecanismos presinápticos (es decir, la magnitud de la liberación del transmisor) y por la respuesta postsináptica. Puesto que los efectos GABAérgicos pre y

postsinápticos se observaron dentro del mismo rango de concentraciones para la PS y la THDOC, no es sencillo predecir cuál es el *target* más probable.

El ERG constituye una herramienta de reconocido valor tanto clínico como básico para evaluar la actividad retiniana y en este caso se utilizó para discernir cuál de los efectos de los NEs prevalece *in vivo*. Los ERG escotópicos se registraron luego de la inyección i.v. de PS o THDOC y los resultados se compararon con los efectos producidos por la VGB y la bicuculina.

El ERG de los vertebrados es el resultado de una combinación de varios componentes con diversas polaridades, originados en distintos tipos de células retinianas. El componente principal del ERG adaptado a la oscuridad en respuesta a un flash de luz intensa es una onda córneo-positiva, conocida como onda b, que se origina por la despolarización de las células bipolares (Stockton y Slaughter, 1989; Gurevich y Slaughter 1993; Robson y Frishman 1995) y/o las células de Müller (Rager 1979; Wen y Oakley 1990).

El GABA reduce la amplitud de onda b en *Xenopus* (Arnarsson y Eysteinnsson, 1997) y en conejos (Gottlob y col., 1985; 1988), aunque en gatos se demostró el efecto opuesto (Naarendorp y Sieving, 1991; Naarendorp y col., 1993). Por otra parte, la bicuculina disminuye la onda b del ERG registrado *in vivo* e *in vitro* en gatos (Naarendorp y col., 1993; Frumkes y col., 1995), e *in vitro* en conejos (Gottlob y col. 1985; 1987) y causa una marcada potenciación de este parámetro en copas de ojo de rana (Popova, 2003) y en retina de ratas (Kapousta-Bruneau, 2000). Por lo tanto, aunque resulta evidente que los receptores GABA_A están implicados en determinar la forma de la onda b, parecería que este efecto es altamente dependiente de la especie. El efecto de GABA o de compuestos relacionados no había sido previamente estudiado en el ERG de hámster.

Como se mencionó en la Introducción y se discutirá más adelante, la VGB es una droga antiepiléptica altamente eficaz (Prasad y col., 2001). Sin embargo, una cantidad considerable de trabajos demuestran que el uso crónico de VGB provoca disfunciones visuales (Eke y col., 1997) y una reducción significativa de la actividad electroretinográfica (McDonagh y col., 2003, Hardus y col., 2003). Estos estudios examinaron sólo los efectos crónicos de la administración sistémica de

VGB y no hay evidencias de efectos electroretinográficos de una dosis única de esta droga. En el presente trabajo se demostró que la administración intravítrea de VGB disminuye significativamente la amplitud de la onda del b del ERG escotópico. Dado que la bicuculina indujo una respuesta opuesta parece posible que el efecto de la VGB esté mediado por un aumento en las concentraciones endógenas de GABA.

A pesar de las múltiples evidencias experimentales del efecto del GABA y de compuestos relacionados sobre las funciones retinianas, no había sido previamente examinado el efecto de los NEs sobre el ERG de vertebrados. Los resultados de este trabajo indican que la PS disminuyó y la THDOC aumentó significativamente la amplitud de la onda b escotópica. Aunque la interacción de los NEs con otras señales retinianas no puede descartarse formalmente, es posible que los efectos de la PS y la THDOC sobre la respuesta electroretinográfica se deban a la interacción de los NEs con el sistema GABAérgico retiniano. En particular, dado que el efecto de la PS fue similar al efecto inducido por la VGB mientras que el efecto de la THDOC lo fue al de la bicuculina, es posible que las acciones de estos NEs sobre la liberación de GABA (más que su influencia sobre el influjo del cloruro) puedan explicar sus efectos electroretinográficos.

La capacidad neuroesteroideogénica retiniana ha sido previamente demostrada en la rata (Guarnieri y col., 1994). Los resultados presentados en esta Tesis que demuestran la presencia del citocromo P450_{scc} por inmunohistoquímica y Western blot, apoyan esta característica retiniana. Sin embargo, mientras que en la retina de rata la CNI exhibe una inmunomarcación leve (Guarnieri y col., 1994), la inmunohistoquímica de P450_{scc} en retina de hámster evidenció una señal intensa en este sitio. La localización de esta enzima en el hámster coincide con la región retiniana en la cual se localiza mayoritariamente el GABA (Figuras 13 y 14). Aunque el perfil de síntesis de esteroides local merece ser examinado con mayor detalle, estos resultados sugieren que la retina de hámster podría exhibir capacidad neuroesteroideogénica. En suma, estos resultados indican que los NEs, probablemente de origen local, regulan en forma significativa la actividad del sistema GABAérgico retiniano tanto a nivel pre- como postsináptico. El efecto evidentemente antagónico de la PS y la

THDOC a nivel de la pre y postsinapsis GABAérgica podía sugerir una regulación bimodal. Sin embargo, los efectos electrorretinográficos de los NEs sugieren que sus efectos presinápticos (es decir, la modulación de la liberación de GABA) podrían prevalecer sobre los efectos postsinápticos (es decir, la modulación del *uptake* de cloruro).

Se ha postulado que los NEs podrían desempeñar un papel regulatorio fisiológico o fisiopatológico modulando la excitabilidad neuronal, a través del principal componente inhibitorio del sistema nervioso central. Dado que el GABA participa activamente en el procesado de la información fótica, la existencia de moduladores locales como los NEs que afecten la actividad del sistema de GABAérgico podrían desempeñar un papel funcional significativo en la fisiología retiniana.

B. Estudio del sistema GABAérgico retiniano en condiciones patológicas

B.1. Disfunciones visuales asociadas al uso de la droga antiepiléptica vigabatrina

Los resultados presentados en este trabajo demuestran que el 89% de la población estudiada de pacientes argentinos tratados con VGB no detectaron al menos un punto dentro de los 40° del campo visual para ambos ojos. Los defectos del campo visual en esta población fueron bilaterales, mientras que ninguno de los pacientes del grupo tratado con CBZ presentó un campo visual anormal. Estudios previos han demostrado que la prevalencia de defectos del campo visual asociada al tratamiento con VGB es variable, extendiéndose desde menos del 0,1%, según lo descrito inicialmente (Martinez y Noack 1997), hasta más del 50%. Los resultados del presente trabajo demuestran una prevalencia claramente mayor que la descrita en la mayoría de los estudios anteriores. Por ejemplo, un estudio realizado en Inglaterra arrojó una prevalencia del 39% (Lawden y col., 1999), mientras que en Finlandia se ha descrito que el 40% de un grupo de pacientes tratados con VGB tuvieron un campo visual anormal (Kalviainen y col., 1999). Asimismo, el 50% de un total de 39 pacientes tratados con VGB examinados en la Universidad Johns Hopkins (Baltimore, E.E.U.U.) presentó anomalías en el campo visual (Miller y col., 1999). No resultan claros los motivos de las diferencias entre éste y otros estudios, aunque no pueden descartarse

factores metodológicos. Para evaluar el campo visual se utilizó un campímetro de Humphrey con una técnica de *screening* en lugar de una técnica de umbral que aunque es más detallada a nivel espacial, es más lenta y provee información sobre el umbral a partir del cual el paciente puede distinguir el estímulo en cada zona del campo visual. La técnica de *screening*, en cambio, proporciona menos información cuantitativa que la técnica de umbral pero es más sensible para detectar una constricción visual. Este estudio se realizó en un ambiente mesópico, con supervisión automática de falsos positivos y falsos negativos, así como del punto de fijación. También con esta técnica se puede obtener una evaluación de la fluctuación de la respuesta a tiempos cortos, reexaminando una determinada zona del campo visual cuando resulta necesario. Otra razón por la que se eligió la técnica de *screening* de campo es que con esta ella se puede evaluar el campo visual hasta los 60°, en cambio la perimetría automatizada de umbral fuera del área de 30° puede ser difícil para el paciente, difícil de interpretar, y presenta considerables diferencias interindividuales. Este aspecto es de interés particular, sobre todo cuando se considera que la disfunción visual asociada al uso de VGB es esencialmente periférica. Además, dado que en este caso los estímulos son supraumbrales, esta estrategia permite la detección de cambios groseros del campo visual de manera confiable. Aunque la evaluación del campo visual se realizó hasta los 60°, el criterio para definir una constricción visual se basó en la localización de un punto no detectado dentro de los 40° centrales, que siendo una información más reproducible podría ser un buen indicador del campo visual en su conjunto. Estas diferencias podrían explicar la mayor prevalencia en la constricción del campo visual para la población de pacientes descrita en este trabajo. De hecho, al considerar solamente los 30° del campo visual en nuestra población, el predominio de la constricción en la población de pacientes examinados es más cercano a la previamente descrita ($\cong 50\%$). Usando una metodología similar, Midelfart y colaboradores (2000) describieron una frecuencia de defectos en el campo visual similar al descrito en este trabajo (86%) en una población de niños epilépticos tratados con VGB.

A pesar de las diferencias entre éste y otros estudios, el patrón de la disfunción ocular parece ser

muy similar. Esta constricción del campo visual, sobre todo en el área nasal retiniana, es considerablemente característica puesto que no ha sido descrita en otras condiciones.

Para examinar con más detalle las funciones visuales, se registraron ERGs escotópicos en los pacientes epilépticos (excepto en el paciente # 2 que no pudo asistir a la consulta). Dado que la determinación de la onda a del ERG mostró una alta variabilidad inter-pacientes, el estudio se centró en la determinación de la onda b, que resultó un parámetro más reproducible. Los pacientes tratados con VGB presentaron una reducción significativa de la onda b. El análisis realizado indicó que el 86% de los pacientes tratados con VGB presentaron una amplitud menor que el límite inferior del intervalo de confianza para los pacientes tratados con CBZ. La frecuencia descrita para la disfunción electroretinográfica en pacientes tratados con VGB es aún más variable que la descrita para la constricción del campo visual. Mientras que en un estudio se demostró que 31 pacientes tratados con VGB tenían un ERG indistinguible de los controles (Lawden y col., 1999), en el estudio de Miller y colaboradores (1999), la mayoría de los pacientes tratados con esta droga presentaron un ERG anormal. Las variaciones descritas en la actividad electroretinográfica registrada por diferentes grupos puede estar relacionada con el hecho de que el ERG es una respuesta graduada, es decir que las amplitudes y otros parámetros de este estudio varían con la intensidad del estímulo.

En concordancia con otros autores, no se observaron cambios en la amplitud o la latencia del componente P100 de los potenciales visuales evocados en ninguno de los pacientes tratados con VGB, lo que permite descartar una disfunción tanto a nivel cortical como del nervio óptico.

El estudio del campo visual requiere la buena colaboración, la atención, y cierta capacidad intelectual del paciente. Aunque en sentido estricto no se observó correlación entre la constricción del campo visual y los cambios electroretinográficos (Figura 45), la prevalencia de la disfunción visual asociada al uso de VGB fue similar en ambos estudios. Estos resultados indican que en pacientes en los que no se puede realizar un estudio confiable del campo visual, el ERG podría ser una alternativa útil para detectar una alteración de las funciones visuales asociada al uso de VGB.

Las anomalías del ERG asociadas al uso del VGB se han observado bajo condiciones fotópicas, implicando al sistema de conos (Krauss y col., 1998; Harding y col., 2000; Johnson y col., 2000). Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo confirman estudios realizados por otros autores (Daneshvar y col., 1999; Miller y col., 1999). Se ha postulado que la reducción de la amplitud de la onda b del ERG asociada al uso de VGB tanto en condiciones fotópicas como escotópicas podría ser el resultado de la disfunción de las células de Müller (Coupland y col., 2001) que desempeñan un papel predominante en el metabolismo de GABA y están implicadas en la generación de la onda b del ERG. Ya se han mencionado algunos de los antecedentes que avalan el papel significativo del GABA en la actividad electroretinográfica y aunque al presente no puede descartarse que los efectos observados sean consecuencia de un proceso de toxicidad provocado por la VGB, es altamente probable que estos cambios puedan atribuirse al aumento persistente en el contenido retiniano de GABA.

Como en estudios de otros autores, ninguno de los pacientes examinados refirió síntomas visuales. El déficit binasal del campo visual asociada al tratamiento con VGB probablemente pase inadvertido para el paciente pues la pérdida de sensibilidad en el campo visual nasal de un ojo se puede compensar por el campo temporal relativamente preservado del ojo contralateral. Sin embargo, de ninguna manera este hecho resta relevancia clínica a la disfunción, sobre todo si se tiene en cuenta la irreversibilidad de la constricción visual descrita por algunos autores (Johnson y col., 2000).

La elección de una droga antiepiléptica depende en primer lugar de su eficacia en determinados tipos de epilepsia. Sin embargo, es imprescindible tener en cuenta si los efectos adversos compensarán las ventajas de la droga elegida. En nuestro caso, cuando se informó a los pacientes sobre los riesgos visuales asociados al uso de esta droga, al menos 3 pacientes decidieron continuar con el tratamiento dado que la VGB en esos casos resultó más efectiva que otros fármacos en cuanto a la sintomatología epiléptica.

Los resultados obtenidos indican que el campímetro de Humphrey hasta los 60° y la

electrorretinografía son herramientas útiles para determinar la disfunción visual asociada al tratamiento con VGB. Asimismo, los resultados indican que en los pacientes tratados con VGB, es necesario controlar regularmente sus campos visuales y/o su actividad electroretinográfica.

Si bien estos resultados confirman que el uso de VGB provoca una disfunción visual significativa, todavía no es claro si esta disfunción es consecuencia de una toxicidad inespecífica de la VGB o, alternativamente, es provocada por el aumento crónico en los niveles retinianos de GABA. Este aspecto tiene un interés particular dado que una variedad considerable de fármacos que estimulan al sistema GABAérgico (y se utilizan como ansiolíticos, sedantes, hipnóticos o antidepresivos) podrían causar alteraciones visuales como efecto secundario. Dos factores principales podrían contribuir a la toxicidad retiniana de la VGB: por un lado, se ha demostrado que en ratas la inactivación de la GABA-T es mayor en la retina que en el cerebro (Sills y col., 2001) y por otro, se observó desarrollo de tolerancia a la VGB en el cerebro y la médula espinal, pero no en la retina (Neal y Shah, 1990). En ratas albinas, pero no en ratas pigmentadas, la VGB provoca una alteración morfológica de la capa nuclear externa (Butler y col., 1987). Muy recientemente, se ha demostrado que el tratamiento de ratas con VGB durante 45 días provoca una disminución en el ERG fotópico así como una desorganización en la CNE, que incluye apoptosis en los conos (Duboc y col., 2004). En el mismo sentido, otros autores han demostrado que el tratamiento crónico de conejos con VGB reduce las funciones visuales asociadas a los conos (Ponjavic y col., 2004). Con el objeto de profundizar el análisis de la disfunción visual asociada a la VGB, se consideró de interés desarrollar un modelo experimental animal, que pudiera permitir el acceso a la retina y con ello obtener evidencias funcionales y morfológicas sobre los mecanismos involucrados. Dado el conocimiento adquirido sobre el sistema GABAérgico en la retina del hámster, se decidió iniciar el desarrollo de un modelo experimental en esta especie, a través de la administración crónica de VGB. Con el objeto de reproducir la situación en los pacientes, se realizó una administración diaria de VGB por vía sistémica. Los resultados presentados indican que el tratamiento con VGB induce una disfunción electroretinográfica significativa en el hámster y por lo tanto remeda en parte las

características observadas en los pacientes. El uso de este modelo animal permitió el estudio del curso temporal del efecto de la administración crónica de VGB que no siempre es posible cuando se trata de estudios en pacientes. En este caso, la amplitud de la onda a disminuyó significativamente a las 3 semanas de tratamiento, mientras que los cambios en la amplitud de la onda b fueron evidentes recién una semana más tarde. Asumiendo que en promedio la vida de los hámsteres es de aproximadamente 2 años, el tiempo de aparición de la sintomatología electroretinográfica sería equivalente a un tratamiento con VGB de aproximadamente 3 años, período compatible con lo observado en los pacientes. En una primera aproximación, estos resultados parecerían contradictorios con los mostrados en la Figura 40, en la que se demostró que una inyección única i.v. de VGB disminuye la amplitud de la onda b medida 1 h después de la inyección. Sin embargo, es relevante tener en cuenta no sólo que ambos estudios difieren en la vía de administración de la VGB (i.v. para el estudio del efecto agudo e i.p. en el tratamiento crónico) y con ello posiblemente en las concentraciones de la droga que llegan a la retina, sino también es posible que ambos resultados describan fenómenos diferentes. En el experimento de inyección i.v. de VGB los resultados reflejan las consecuencias de modificar en forma aguda y transitoria las concentraciones retinianas de GABA mientras que los resultados del experimento crónico deben interpretarse a la luz de un cambio persistente en las concentraciones de GABA tanto en la retina como en otras estructuras o bien a la toxicidad del uso crónico de la VGB. De hecho, una inyección de VGB tanto i.v. como i.p. carece de efectos significativos luego de 24 h (datos no mostrados). Por lo tanto, aún cuando en ambos casos esté afectado el mismo parámetro (la amplitud de la onda b escotópica) es posible que el mecanismo de génesis de estos cambios sea diferente. Además, dado que la onda b del ERG refleja la actividad de distintos tipos celulares retinianos, no puede descartarse que el sustrato anatómico de los cambios observados en ambos estudios sea también diferente. Si bien al presente no se dispone de datos que permitan identificar el tipo celular retiniano y los mecanismos involucrados en los efectos de la administración crónica de VGB en el hámster, se planea continuar con esta línea experimental con el fin de elucidar las consecuencias funcionales y morfológicas del

aumento crónico en la concentración retiniana de GABA.

B.2. Estudio de la actividad del sistema GABAérgico en animales con hipertensión ocular

Los resultados presentados indican que la inyección intracameral crónica de AH en ratas provoca un aumento significativo de la PIO con respecto al ojo inyectado con solución salina. La inyección semanal indujo una hipertensión ocular sostenida y significativa durante todo el estudio (10 semanas). La concentración de AH utilizada en este trabajo (1%) es similar a la que contienen los preparados farmacéuticos utilizados actualmente en cirugía oftalmológica, que también provocan un aumento significativo de la PIO (Jurgens y col., 1997). En concordancia con estos resultados se ha demostrado que la inyección de condroitín sulfato en la cámara anterior de ojos de gato y conejo aumenta la PIO (Pei y col., 1984; Yue y col., 1984). Ambos tipos de GAGs coexisten en la matriz extracelular del trabeculado de distintas especies, y probablemente actúen de manera similar en el incremento de la presión. Dado que los GAGs podrían reducir el diámetro funcional de los espacios de la red trabecular, es posible que el AH inyectado actúe de forma similar al mucopolisacárido de origen endógeno, es decir, impidiendo el flujo normal del humor acuoso.

Varios grupos han desarrollado modelos de hipertensión ocular en ratas, generalmente impidiendo el flujo de humor acuoso (Moore y col., 1993; Shareef y col., 1995; Ueda y col., 1998). Cada uno de estos modelos ofrece ventajas y desventajas. Si bien en este caso son necesarias múltiples inyecciones de AH para lograr una hipertensión sostenida, los resultados obtenidos demuestran que éstas no afectan la PIO *per se*. En todo caso, este inconveniente afecta igualmente a otros modelos en los que son necesarias sucesivas inyecciones de solución hipertónica o aplicaciones de láser. Por el contrario, el modelo descrito en este trabajo ofrece varias ventajas: 1) es un método económico, fácil de realizar, y no requiere técnicas quirúrgicas complejas; 2) permite obtener una PIO alta en forma persistente; 3) permite obtener un curso temporal razonablemente largo como para modelar una patología crónica; y 4) a diferencia del modelo de cauterización de las venas episclerales (Shareef y col., 1995), el AH no afecta el flujo sanguíneo hacia afuera del ojo. En suma, estos

resultados indican que la administración intracameral de AH podría constituir un nuevo modelo de hipertensión ocular en ratas.

Aunque el aumento de la PIO constituye el principal factor de riesgo en el glaucoma, una hipertensión ocular sostenida no implica necesariamente la neuropatía característica de esta enfermedad. Por lo tanto, la continuación lógica de estos experimentos fue analizar el estado funcional y morfológico de las retinas de estos animales con hipertensión ocular. Los resultados obtenidos indican que la administración intracameral de AH induce una disminución significativa de la actividad electroretinográfica. En este sentido, se observó una disminución significativa de las amplitudes de las ondas a y b del ERG escotópico, sin cambios en las respectivas latencias. Luego de 10 semanas, la disminución de las amplitudes de ambas ondas fue mayor que la observada a la 6^a semana, lo que avala la progresión de esta disfunción en función de la duración de la hipertensión ocular. Haciendo una extrapolación similar a la ya mencionada, se podría estimar que un período de 10 semanas en estos animales, es homologable a 8 años en el humano. La experiencia clínica indica que la duración de esta hipertensión ocular es un período compatible con el inicio de la manifestación de la neuropatía.

Si bien el ERG es una herramienta universalmente reconocida como método de evaluación de la función retiniana, en tanto constituye un reflejo integral de este parámetro, no permite obtener evidencias directas sobre el sitio primario involucrado en una determinada disfunción. Para analizar este aspecto se realizó el análisis histológico de las retinas de animales inyectados con AH o vehículo. Aunque no se observaron diferencias en la CPI, la CNI, y la CNE, sí se observó una pérdida significativa ($\cong 40\%$) de células en la capa de células ganglionares. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por otros grupos que usaron diferentes metodologías para inducir un glaucoma experimental (Grozdanic y col., 2003). En los ojos inyectados con vehículo se observó una morfología compatible con un nervio sano e intacto. Los axones individuales mostraron homogeneidad en cuanto a la forma y se observó un empaquetamiento estrecho formando las fibras del nervio. En los ojos hipertensos, en cambio, se observó una pérdida global de integridad, así

como un cambio notorio en la forma de los axones. Los resultados hasta aquí discutidos demuestran que la inyección crónica intracameral de AH provoca una hipertensión ocular sostenida que se acompaña de cambios funcionales e histológicos compatibles con el glaucoma humano. Por lo tanto, este modelo podría constituir una poderosa herramienta para elucidar el conjunto de mecanismos que asocian el aumento de la PIO con la muerte celular glaucomatosa.

En trabajos recientes de nuestro laboratorio se han obtenido evidencias que constituyen la primera demostración experimental de cambios significativos en el reciclado retiniano de glutamato a las 3 semanas de hipertensión ocular inducida por AH (Moreno y col., 2005). Por lo tanto, teniendo en cuenta la estrecha relación entre los sistemas glutamatérgico y GABAérgico a nivel retiniano, se evaluó la actividad de este último a las 3 semanas de hipertensión ocular, momento en que la alteración de los parámetros del ciclo de glutamato/glutamina es significativa. Los resultados obtenidos en este trabajo describen por primera vez una alteración en el sistema GABAérgico retiniano en un modelo experimental de glaucoma. La administración intracameral de AH indujo una disminución en el *turnover* de GABA, que coincidió con una disminución en la actividad de GAD. Por otro lado, aunque no se encontraron cambios en la liberación de GABA, se observó un aumento en el *uptake* del neurotransmisor. En conjunto, estos resultados podrían indicar un déficit de la función GABAérgica retiniana luego de períodos tempranos de hipertensión ocular. Como ya se mencionara en la Introducción, diversas líneas experimentales, incluidas evidencias obtenidas en nuestro laboratorio, sugieren que la excitotoxicidad por glutamato podría constituir un factor causal en la neuropatía glaucomatosa. La actividad de la retina como la del resto del sistema nervioso central es el resultado de un ajustado balance entre señales excitatorias e inhibitorias. Como ya se mencionara repetidamente, el GABA es el principal neurotransmisor inhibitorio retiniano y por lo tanto, los resultados que demuestran una disminución tanto en la síntesis de GABA (como lo refleja la disminución del *turnover* y de la actividad de GAD), como en los niveles sinápticos del neurotransmisor (como lo sugiere el aumento en la recaptación de GABA) podría contribuir a un predominio de las señales excitatorias sobre la inhibitorias y consecuentemente a una desregulación

significativa de la neuroquímica retiniana en ojos hipertensos. Las evidencias previas obtenidas en nuestro laboratorio que demuestran un aumento en las concentraciones sinápticas de glutamato junto con los resultados de este trabajo de Tesis podrían resignificar el concepto de excitotoxicidad. En este nuevo paradigma, la toxicidad del glutamato, demostrada experimentalmente en diversos modelos animales, podría ser significativamente potenciada por el déficit inhibitorio descrito. Los cambios en ambos sistemas de neurotransmisión fueron observados en períodos tempranos, anteriores a los cambios funcionales e histológicos descritos en este modelo experimental. Por lo tanto, es posible sugerir que ambos fenómenos podrían constituir eventos causales en la disfunción visual asociada a la hipertensión ocular.

En trabajos recientes hemos demostrado que los niveles de melatonina disminuyen significativamente en la retina de animales tratados con AH durante 3 semanas (Moreno y col., 2004). Esta evidencia, junto con los resultados presentados en este trabajo sobre el efecto estimulador de este metoxiindol sobre la actividad GABAérgica (al menos en la retina de hámster) podría señalar a la caída en la producción de melatonina en ojos hipertensos como uno de los factores responsables del déficit GABAérgico descrito. Si bien aún quedan varios aspectos por explorar (el curso temporal de los cambios en la actividad GABAérgica, el estado funcional de los receptores de GABA, los mecanismos involucrados en los efectos descritos, y sobre todo la evaluación del sistema GABAérgico en otros modelos experimentales de glaucoma, entre otros), estos resultados constituyen la primera demostración experimental que vincula al GABA con la neuropatía glaucomatosa.

El glaucoma es una patología compleja con varios factores de riesgo, en la que probablemente convergen diversos mecanismos involucrados en la muerte celular. La terapéutica contemporánea está esencialmente destinada a disminuir la PIO. Sin embargo, en muchos casos se ha observado que la pérdida visual persiste luego de su restauración a valores normales. Por lo tanto, la terapia de nueva generación aspira a incluir *neuroprotectores* que puedan ser utilizados como herramientas complementarias con otros medicamentos diseñados para disminuir el insulto inicial (hipotensores

oculares). Los resultados obtenidos podrían contribuir a identificar factores causales, particularmente la disfunción del sistema GABAérgico en la neurotoxicidad glaucomatosa. Si bien algunos tratamientos noveles para el glaucoma todavía en estudio, consideran la posibilidad de bloquear la actividad glutamatérgica, estos resultados podrían contribuir al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento del glaucoma de alta presión, a través del uso concomitante de fármacos que restauren la actividad GABAérgica disminuida en forma significativa, al menos en este modelo experimental. Particularmente, la demostración experimental obtenida en esta Tesis acerca del efecto potenciador de la melatonina sobre la actividad GABAérgica retiniana, podría constituir una evidencia de consideración para el uso de melatonina con fines terapéuticos en el glaucoma. Paralelamente a los resultados obtenidos en el marco de esta Tesis, otros resultados indican que la melatonina: 1) es un potente inhibidor del sistema nitrérgico retiniano (Sáenz y col., 2003), 2) es un antioxidante retiniano (Siu y col., 1999), y 3) aumenta significativamente el *clearance* de glutamato sináptico (Sáenz y col., 2004). Dado que el aumento en los niveles de NO, el daño oxidativo, la excitotoxicidad glutamatérgica y eventualmente la disminución de la actividad GABAérgica retiniana podrían constituir factores causales de la neuropatía glaucomatosa, este conjunto de evidencias avalan sólidamente la potencialidad del uso de melatonina con fines terapéuticos en el glaucoma. Una ventaja adicional para ello es que este compuesto probadamente carece de efectos tóxicos aun en altas concentraciones. Al presente, se están realizando los experimentos pertinentes para evaluar esta hipótesis.

Ahora bien, ¿cuáles son las posibles consecuencias de los hallazgos descritos en el marco de la fisiopatología retiniana?

Los organismos vivos estamos “programados” para alcanzar ciertas metas: sobrevivir y reproducirnos. Nuestras funciones están destinadas a alcanzar y mantener la máxima flexibilidad conductual para reaccionar y actuar frente al ambiente que nos rodea, manteniéndonos preparados para enfrentar lo inesperado. Un principio clave de organización de las funciones adaptativas es el

acoplamiento de la generación de variabilidad frente a la demanda funcional. Mientras oscilan a través de todos sus modos operacionales, los seres vivos sanos usan su capacidad funcional para asegurar una alta probabilidad de solucionar los problemas que deben enfrentar. En este contexto, una enfermedad podría ser considerada como la consecuencia de un continuo desacople (provocado por diferentes razones) entre las presiones que ejerce el ambiente sobre los sistemas vivos y su capacidad de adaptarse a ellas. Sorprendentemente, se dispone de escasa información experimental sobre el tópico de la generación de variabilidad en el sistema nervioso. De hecho, la variabilidad biológica parece haber sido un anatema como tópico dado lo indeseable de las incertidumbres para los estudios estadísticos, o porque es intelectualmente perturbador para aquellos que tienden (tendemos, en realidad) al pensamiento tipológico.

Paradójicamente, el amplio espectro en el rango de adaptación funcional en el sistema nervioso es posible gracias a la actividad de interneuronas inhibitorias. Las proyecciones inhibitorias y los circuitos neurales locales inhibitorios (mayoritariamente GABAérgicos) desempeñan un papel central en el procesado de la información cerebral en general y retiniana en particular. Es la inhibición en todas sus formas la que permite al sistema nervioso y por lo tanto al resto del organismo generar la variabilidad en la conducta que permite ajustar la extensión y velocidad a la que oscila la disponibilidad funcional hasta lograr su capacidad adaptativa. El precio para ello es considerablemente alto, prácticamente la mitad de la glucosa y el oxígeno que utiliza el cerebro se emplea en la nutrición de los elementos interneuronales inhibitorios.

Dentro de sectores del sistema nervioso central, las influencias desincronizadoras están mediadas mayoritariamente por circuitos de interneuronas inhibitorias interpuestos entre los elementos de salida de la información (*output*) y sinápticamente activados por ellos. A su vez, estas interneuronas hacen extensivas sinapsis con los elementos de salida y entre ellas mismas. Los elementos de salida usualmente se comunican a través de la liberación de neurotransmisores excitatorios, fundamentalmente glutamato. Las neuronas de proyección entre una estructura y otra (excitatoria o inhibitoria) frecuentemente se distribuyen en forma laminar, apareciendo en arreglos esencialmente

paralelos en un corte de tejido. Esta regularidad relativa en los arreglos de los elementos de proyección neuronal contrasta en forma notable con la irregularidad de las interneuronas inhibitorias y sus terminales. La disposición de elementos GABAérgicos observada en la retina del hámster no escapa a esta generalidad. En este sentido, se observaron células conteniendo GABA en elementos distribuidos en forma irregular sobre todo cuando se compara con la estructura cristalina y ordenada de la retina en su conjunto.

Cuando se libera la actividad de una unidad neural se activan sus componentes (interneuronas y vías de salida) facilitando el procesado de la información que proviene de otra unidad neural y la comunicación de la información procesada con otras unidades o estructuras efectoras (músculos, glándulas, etc.). Las neuronas inhibitorias tónicamente activas conforman una barrera al pasaje de la información a través de la unidad neural que provoca niveles variables de actividad y evita respuestas de tipo “todo o nada”. Esto tiene como resultado un efecto desincronizador sobre la salida de la información porque la conectividad y las condiciones locales en la vecindad de las neuronas aun muy cercanas difieren significativamente. Sin embargo, la mayor influencia desincronizadora a nivel local proviene de las interneuronas inhibitorias fásicamente activas y distribuidas en forma ubicua, que a través de sus múltiples ramas participan en procesos muy variados de estructuración de la actividad, tales como la inhibición pre- y postsináptica, la desinhibición y la facilitación postsináptica. Cuando la información se procesa con más eficiencia, el aumento en la actividad provocado en una determinada unidad neural se acompaña de un incremento tanto en la extensión de la salida de la información como en su variabilidad. La interposición de interneuronas inhibitorias en los circuitos neurales permite al sistema nervioso (en todos los niveles) ser su propio generador de variabilidad, es decir, la presencia de elementos inhibitorios provee a la unidad neural de una capacidad expansible para procesar la información en relación a la demanda. Dada su disposición irregular y su plasticidad estructural y metabólica, las unidades neurales en las cuales estos elementos inhibitorios participan poseen “creatividad” local, y permiten lograr una solución impredecible para los problemas a los cuales están enfrentadas

constantemente, así como retener la “memoria” de esas soluciones. Esta perspectiva para el análisis de la actividad GABAérgica originalmente propuesta por E. Roberts (1986) podría proveer un marco teórico apropiado para la interpretación de los resultados de esta Tesis. Dado el papel central del GABA en el procesado de la información no resulta sorprendente que este sistema retiniano sea heterogéneo (en su localización y en los mecanismos involucrados en su liberación), sensible a diversas señales modulatorias (como la melatonina y los neuroesteroides), e incluso pueda desempeñar un papel relevante en sistemas tan complejos como lo es la génesis de la actividad rítmica de la retina y la comunicación entre la retina y el reloj hipotalámico. También desde esta perspectiva es posible analizar la participación del sistema GABAérgico en situaciones patológicas retinianas. En este trabajo de Tesis se han obtenido evidencias que permiten sugerir que tanto un aumento en los niveles retinianos de GABA (resultado de la administración de VGB), como una disminución en la actividad de este sistema (en el modelo de glaucoma experimental) podrían interferir seriamente con una función retiniana normal. En un sistema neural en el cual las neuronas inhibitorias son removidas, descontroladas o sencillamente son disfuncionales, se pierde la capacidad de procesar la información dentro de la unidad neural, dando predominio o inhibición de los elementos excitatorios de salida. Cuando por diversos motivos ocurre una incoordinación en un sitio cerebral crítico se pueden producir reverberaciones drásticas en el sistema nervioso en su conjunto, como se observa en las convulsiones epilépticas características del *grand mal* provocadas por lesiones corticales focales. No en vano la farmacología antiepiléptica se basa esencialmente en compuestos que aumentan la actividad GABAérgica mientras que los inhibidores GABAérgicos pueden provocar convulsiones. En condiciones ambientales relativamente simples para los individuos con esta incoordinación, el sistema nervioso puede funcionar en forma aparentemente normal pero a medida que la complejidad y la intensidad del ambiente aumentan, también aumenta la extensión del desacople entre el aumento de la actividad y el grado de asincronía de la actividad dentro y entre las unidades neurales, y como consecuencia se produce una actividad oscilatoria sincrónica y masiva. Quizás por esas razones, los pacientes epilépticos tratados con VGB o las ratas

glaucomatosas conservan algunas de las funciones visuales más simples, pero pierden funciones visuales más complejas. Es decir, la *quintaesencia* de la función del sistema nervioso en general y de la retina en particular podría depender de una función adecuada del sistema GABAérgico. Parece imprescindible que la actividad del sistema GABAérgico se mantenga dentro de límites probablemente estrictos para mantener una función neuronal (retiniana, en nuestro caso) no patológica.

Prácticamente la tercera parte del nivel más alto de organización del cerebro humano, la corteza cerebral, está dedicada al procesado visual. Desde nuestros ojos emergen dos millones de fibras que conforman el nervio óptico, en tanto que el nervio auditivo, instrumental en el proceso de audición, se compone de apenas 30.000 fibras. La visión valida todos nuestros otros sentidos; cuando oímos, olemos, o tocamos algo, usualmente, y en forma espontánea, tendemos a observarlo. Estudios estadísticos en países desarrollados indican que perder la visión constituye uno de los miedos primarios más frecuentes. Probablemente por estas razones, la visión es el sentido más estudiado por los investigadores, aunque cualquier neurobiólogo podría decir, sin temor a equivocarse, que estamos todavía muy lejos de comprender este fenómeno en toda su magnitud. En este contexto, las evidencias obtenidas en el marco de esta Tesis demuestran que el sistema GABAérgico retiniano podría desempeñar un papel central en el complejo conjunto de mecanismos imprescindibles para comunicarnos armónicamente con el mundo que nos rodea.

Conclusiones

En este trabajo de Tesis se han obtenido las siguientes conclusiones generales:

- En la retina de hámster, la liberación de GABA involucra mecanismos dependientes e independientes de Ca^{2+} , que probablemente se corresponden con mecanismos vesiculares y de inversión del transportador.
- En la retina de hámster, el GABA se localiza en células amácrinas, amácrinas desplazadas y en células horizontales.
- El GABA, que aumenta la producción retiniana de melatonina a través de un receptor de tipo $GABA_A$, podría formar parte de los mecanismos de señales de la oscuridad que modulan la producción de este metoxiindol.
- La actividad del sistema GABAérgico oscila significativamente en función de la hora del día aún en condiciones de oscuridad constante, lo que sugiere que este sistema está controlado por un oscilador circadiano endógeno.
- La melatonina aumenta la actividad pre- y postsináptica GABAérgica, lo que sugiere un mecanismo de *feedback* positivo entre ambas señales.
- El sistema GABAérgico retiniano podría estar involucrado en la transferencia de información fótica a los núcleos supraquiasmáticos hipotalámicos.
- Los neuroesteroides modulan significativamente la actividad pre- y postsináptica GABAérgica. Asimismo, estos compuestos regulan la actividad electroretinográfica en el hámster.

- La prevalencia de la disfunción visual asociada al uso de vigabatrina en pacientes epilépticos podría ser mayor que la descrita por otros autores. La campimetría de *screening* con el campímetro de Humphrey y la electroretinografía podrían ser herramientas útiles para evaluar esta disfunción visual.
- La administración crónica de vigabatrina en el hámster produce una disfunción electroretinográfica que se correlaciona con la disfunción observada en los pacientes. Por lo tanto, éste podría ser un modelo experimental para el estudio de los mecanismos de toxicidad retiniana inducidos por vigabatrina.
- En un modelo de glaucoma experimental en ratas, la actividad del sistema GABAérgico disminuye significativamente.

Bibliografía

- Acott TS, Westcott M, Passo MS, Van Buskirk EM (1985). Trabecular meshwork glycosaminoglycans in human and cynomolgus monkey eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 26, 10: 1320-1329
- Acuña-Castroviejo D, Lowenstein PR, Rosenstein R, Cardinali DP. (1986b). Diurnal variations of benzodiazepine binding in rat cerebral cortex: disruption by pinealectomy. *J Pineal Res.* 3(2):101-9.
- Acuña-Castroviejo D., Rosenstein RE, Romeo HE, Cardinali DP (1986a) Changes in gamma-aminobutyric acid high affinity binding to cerebral cortex membranes after pinealectomy or melatonin administration to rats. *Neuroendocrinol.* 43, 24-31.
- Agardh E, Ehinger B, and Wu JY. (1987) GABA and GAD-like immunoreactivity in the primate retina. *Histochemistry.* 86, 485-490
- Aguilar-Roblero R., Verduzco-Carbajal L., Rodriguez C., Mendez-Franco J., Moran J., de la Mora M.P. (1993) Circadian rhythmicity in the GABAergic system in the suprachiasmatic nuclei of the rat, *Neurosci. Lett.* 157 199-202.
- Anderson R., Mitchell R. (1985) Effects of GABA receptor agonists on [³H]dopamine release from median eminence and pituitary neurointermediate lobe. *Eur J Pharmacol.* 115, 109-112.
- Andrade da Costa BL, de Mello FG, Hokoc JN. (2000) Transporter-mediated GABA release induced by excitatory amino acid agonist is associated with GAD-67 but not GAD-65 immunoreactive cells of the primate retina. *Brain Res.* 863(1-2):132-42.
- Andrade da Costa BL, Hokoc JN. (2003) Coexistence of GAD-65 and GAD-67 with tyrosine

hydroxylase and nitric oxide synthase in amacrine and interplexiform cells of the primate, *Cebus apella*. *Vis Neurosci.* 20(2):153-63.

- Arbilla S, Kamal L, Langer SZ (1979) Presynaptic GABA autoreceptors on GABAergic nerve endings of the rat substantia nigra. *Eur J Pharmacol.* 57, 211-217.
- Arnarsson A, Eysteinnsson T. (1997) The role of GABA in modulating the *Xenopus* electroretinogram. *Vis Neurosci.* 14, 1143-1152
- Aschoff J. Exogenous and endogenous components in circadian rhythms. (1960) *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 25:11-28.
- Axelrod J. (1974) The pineal gland: a neurochemical transducer. *Science.* 184(144):1341-8.
- Ayoub GS, Lam DM. (1984) The release of gamma-aminobutyric acid from horizontal cells of the goldfish (*Carassius auratus*) retina. *J Physiol.* 355:191-214.
- Balsalobre A, Brown SA, Marcacci L, Tronche F, Kellendonk C, Reichardt HM, Schutz G, Schibler U. (2000) Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. *Science.* 289(5488):2344-7.
- Barrot M, Vallee M, Gingras MA., Le Moal M, Mayo W, Piazza PV (1999) The neurosteroid pregnenolone sulphate increases dopamine release and the dopaminergic response to morphine in the rat nucleus accumbens. *Eur J Neurosci.* 11, 3757-3760.
- Baulieu E. E., Robel P. (1998) Dehydroepiandrosterone (DHEA) and dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) as neuroactive neurosteroids. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95, 4089-4091.

- Belelli D, Casula A, Ling A, Lambert JJ. (2002) The influence of subunit composition on the interaction of neurosteroids with GABA(A) receptors. *Neuropharmacology*. 43, 651-61.
- Benozzi J, Jaliffa CO, Firpo Lacoste F, Weinberg Llomovatte D, Keller Sarmiento M, Rosenstein RE. (2000) Effect of brimonidine on rabbit trabecular meshwork hyaluronidase activity. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 41(8), 2268-2272.
- Bernath S. (1992) Calcium-independent release of amino acid neurotransmitters: fact or artifact? *Prog Neurobiol*. 38(1):57-91.
- Berson DM, Dunn FA, Takao M. (2002) Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science*. 295(5557):1070-3.
- Besharse JC, Dunis DA. (1983) Methoxyindoles and photoreceptor metabolism: activation of rod shedding. *Science*. 219(4590):1341-3.
- Besharse JC, Iuvone PM. (1983) Circadian clock in *Xenopus* eye controlling retinal serotonin N-acetyltransferase. *Nature*. 8-14;305(5930):133-5.
- Besharse JC, Spratt G. (1988) Excitatory amino acids and rod photoreceptor disc shedding: analysis using specific agonists. *Exp Eye Res*. 47(4):609-20.
- Bloomfield SA, Xin D. (2000) Surround inhibition of mammalian AII amacrine cells is generated in the proximal retina. *J Physiol*. 523 Pt 3:771-83.
- Boatright JH, and Iuvone PM (1989 b) GABA and the regulation of serotonin N-acetyltransferase activity in amphibian retina -II The role of dopamine. *Neurochem Int*. 15,

549-554.

- Boatright JH, Iuvone PM., (1989 a) GABA and the regulation of serotonin N-acetyltransferase activity in amphibian retina -I. Effects of GABA agonists and antagonists. *Neurochem Int.* 15, 541-547
- Boatright JH, Rubim NM, Iuvone PM. (1994) Regulation of endogenous dopamine release in amphibian retina by melatonin: the role of GABA. *Vis Neurosci.* 11(5):1013-8
- Bolz J, Frumkes T, Voigt T, Wassle H. (1985) Action and localization of gamma-aminobutyric acid in the cat retina. *J. Physiol.* 362, 369-393,
- Bonanno G, Cavazzani P, Andrioli GC, Asaro D, Pellegrini G, Raiteri M. (1989) Release-regulating autoreceptors of the GABAB-type in human cerebral cortex. *Br J Pharmacol.* 96, 341-346.
- Bonanno G, Raiteri M (1993) Gamma-Aminobutyric acid (GABA) autoreceptors in rat cerebral cortex and spinal cord represent pharmacologically distinct subtypes of the GABAB receptor. *J Pharmacol Exp Ther.* 265, 765-770
- Bormann J. (2000) The 'ABC' of GABA receptors. *Trends Pharmacol Sci.* 21(1):16-9.
- Bowlby MR. (1993) Pregnenolone sulfate potentiation of N-methyl-D-aspartate receptor channels in hippocampal neurons. *Mol Pharmacol.* 43, 813-819.
- Brainard GC, Morgan WW. (1987) Light-induced stimulation of retinal dopamine: a dose-response relationship. *Brain Res.* 424(1):199-203.

- Brandon C, Criswell MH. (1995) Displaced starburst amacrine cells of the rabbit retina contain the 67-kDa isoform, but not the 65-kDa isoform, of glutamate decarboxylase. *Vis Neurosci.* 12(6):1053-61.
- Brennan MJ, Cantrill RC, Oldfield M, Krogsgaard-Larsen P. (1981). Inhibition of gamma-aminobutyric acid release by gamma-aminobutyric acid agonist drugs. *Pharmacology of the gamma-aminobutyric acid autoreceptor.* *Mol Pharmacol.* 19, 27-30.
- Brew H, Attwell D. (1987) Electrogenic glutamate uptake is a major current carrier in the membrane of axolotl retinal glial cells. *Nature.* 327 (6124):707-9.
- Brussaard AB, Kits KS, Baker RE, Willems WP, Leyting-Vermeulen JW, Voorn P, Smit AB, Bicknell RJ, Herbison AE. (1997). Plasticity in fast synaptic inhibition of adult oxytocin neurons caused by switch in GABA(A) receptor subunit expression. *Neuron.* 19, 1103-1114.
- Brussaard AB, Koksma JJ (2003) Conditional regulation of neurosteroid sensitivity of GABA_A receptors. *Ann N Y Acad Sci.* 1007, 29-36.
- Bubenik GA, Purtil RA, Brown GM, Grota LJ. (1978) Melatonin in the retina and the Harderian gland. Ontogeny, diurnal variations and melatonin treatment. *Exp Eye Res.;* 27(3):323-33.
- Butler WH, Ford GP, Newberne JW. (1987) A study of the effects of vigabatrin on the central nervous system and retina of Sprague Dawley and Lister-Hooded rats. *Toxicol Pathol.* 15: 143-148.
- Cahill G. M. y Besharse J. C. (1995) Circadian rhythmicity in vertebrate retinas: Regulation

by a photoreceptor oscillator. 14 (1) 267-291

- Cahill GM y Besharse JC. (1993) Circadian clock functions localized in *Xenopus* retinal photoreceptors. *Neuron*. 10, 573-577.
- Cahill GM, Besharse JC. (1989) Retinal melatonin is metabolized within the eye of *xenopus laevis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 86(3):1098-102.
- Cahill GM, Grace MS, Besharse JC. (1991) Rhythmic regulation of retinal melatonin: metabolic pathways, neurochemical mechanisms, and the ocular circadian clock. *Cell Mol Neurobiol*. 11(5):529-60.
- Cardinali DP, and Golombek DA (1998) The rhythmic GABAergic activity. *Neurochem. Res*. 23, (5), 611-618.
- Carette B, Poulain P. (1984) Excitatory effect of dehydroepiandrosterone, its sulphate ester and pregnenolone sulphate, applied by iontophoresis and pressure, on single neurones in the septo-preoptic area of the guinea pig. *Neurosci Lett*. 45, 205-210.
- Carter-Dawson, L., Crawford, M. L., Harwerth, R. S., Smith, E. L. 3rd, Feldman, R., Shen, F. F. (2002) Vitreal glutamate concentration in monkeys with experimental glaucoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 43, 2633-2637.
- Cassone VM, Warren WS, Brooks DS, Lu J. (1993) Melatonin, the pineal gland, and circadian rhythms. *J Biol Rhythms*. 8 Suppl:S73-81
- Celebi S, Dilsiz N, Yilmaz T, Kukner AS. (2002). Effects of melatonin, vitamin E and

octreotide on lipid peroxidation during ischemia-reperfusion in the guinea pig retina. *Eur J Ophthalmol.* 12:77-83.

- Cioffi GA (2001). Three common assumptions about ocular blood flow and glaucoma *Surv Ophthalmol.* 45 (6 suppl 1): S325-331.
- Contini M, Raviola E. (2003) GABAergic synapses made by a retinal dopaminergic neuron. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 4; 100(3):1358-63.
- Cooper EJ, Johnston GA, Edwards FA. (1999) Effects of a naturally occurring neurosteroid on GABA_A IPSCs during development in rat hippocampal or cerebellar slices. *J Physiol.* 521, 437-449.
- Coupland SG, Zackon DH, Leonard BC, Ross TM. (2001). Vigabatrin effect on inner retinal function. *Ophthalmology.* 108: 1493-1496
- Cuzzocrea S, Zingarelli B, Gilad E, Hake P, Salzman AL, Szabo C. (1997). Protective effect of melatonin in carrageenan-induced models of local inflammation: relationship to its inhibitory effect on nitric oxide production and its peroxynitrite scavenging activity. *J Pineal Res.* 23:106-116.37
- Daneshvar H, Racette L, Coupland SG, Kertes PJ, Guberman A, Zackon D. (1999). Symptomatic and asymptomatic visual loss in patients taking vigabatrin. *Ophthalmology.* 106: 1792-1798.
- Della Maggiore V, Ralph MR. (1999) Retinal GABA(A) receptors participate in the regulation of circadian responses to light. *J. Biol. Rhythms.* 14 (1), 47-53.

- Demirgoren S, Majewska MD, Spivak CE, London ED. (1991) Receptor binding and electrophysiological effects of dehydroepiandrosterone sulfate, an antagonist of the GABAA receptor. *Neuroscience*. 45(1):127-35.
- Dkhissi O, Chanut E, Wasowicz M, Savoldelli M, Nguyen-Legros J. (1999). *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 40, 5, 990-995.
- Dowling J., Ehinger B. (1978) Synaptic organization of the dopaminergic neurons in the rabbit retina. *J. Comp. Neurol.* 180, 203-220.
- Dowling, J. (1987) *En: The Retina*. Harvard University Press, Cambridge, Mass.
- Dreyer, E. B., Zurakowski, D., Schumer, R. A., Podos, S. M., Lipton, S. A. (1996) Elevated glutamate in the vitreous body of humans and monkeys with glaucoma. *Arch. Ophthalmol.*, 114, 299-305.
- Duarte CB, Ferreira IL, Santos PF, Oliveira CR, Carvalho AP. (1993) Glutamate increases the $[Ca^{2+}]_i$ but stimulates Ca^{2+} -independent release of $[^3H]GABA$ in cultured chick retina cells. *Brain Res.* 611(1):130-8.
- Duboc A, Hanoteau N, Simonutti M, Rudolf G, Nehlig A, Sahel JA, Picaud S. (2004). Vigabatrin, the GABA-transaminase inhibitor, damages cone photoreceptors in rats. *Ann Neurol.* 55(5):695-705.
- Dubocovich M.L. (1983) Melatonin is a potent modulator of dopamine release in the retina. *Nature.* 204, 183-184.

- Dubocovich ML, Takahashi JS. (1987) Use of 2-[125I]iodomelatonin to characterize melatonin binding sites in chicken retina. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84(11):3916-20.
- Eke T, Talbot JF, Lawden MC. (1997) Severe persistent visual field constriction associated with vigabatrin. *BMJ.* 314 180-181.
- Faillace MP, Cutrera R, Keller Sarmiento MI, and Rosenstein RE. (1995) Evidence for local synthesis of melatonin in golden hamster retina. *Neuroreport.* 6, 2093-2095.
- Faillace MP, Keller Sarmiento MI, Nicola Siri L, and Rosenstein RE. (1994) Diurnal variations in cyclic AMP and melatonin content of golden hamster retina. *J. of Neurochem.* 62, 1995-2000.
- Faillace MP, Keller Sarmiento MI, Rosenstein RE. (1996 a) Melatonin effect on ³H glutamate uptake and release in the golden hamster retina. *J. Neurochem.* 67, 623-627.
- Faillace MP, Keller Sarmiento MI, Rosenstein RE. (1996 b) Daily variations in cGMP, guanylate cyclase and phosphodiesterase in the golden hamster retina. *Vision Res.* 36, 1365-1369.
- Fancsik A, Linn DM, Tasker JG. (2000) Neurosteroid modulation of GABA IPSCs is phosphorylation dependent. *J Neurosci.* 20, 3067-3075.
- Fleischmann A, Etgen AM, Makman MH. (1992) Estradiol plus progesterone promote glutamate-induced release of gamma-aminobutyric acid from preoptic area synaptosomes. *Neuropharmacology.* 31(8):799-807.

- Floran B, Silva I, Nava C, Aceves J. (1988) Presynaptic modulation of the release of GABA by GABA_A receptors in pars compacta and by GABA_B receptors in pars reticulata of the rat substantia nigra. *Eur J Pharmacol.* 150, 277-286.
- Francois J, Benozzi G, Victoria-Troncoso V, Bohyn W. (1984) Ultrastructural and morphometric study of corticosteroid glaucoma in rabbits. *Ophthalmic Res.* 16(3):168-78.
- Freed MA. (1992) GABAergic circuits in the mammalian retina. *Prog Brain Res.* 90:107-31.
- Frumkes TE, Nelson R, Pflug R. (1995) Functional role of GABA in cat retina: II. Effects of GABA_A antagonists. *Vis Neurosci.* 12, 651-661.
- Fujieda H, Scher J, Hamadanizadeh SA, Wankiewicz E, Pang SF, Brown GM. (2000). Dopaminergic and GABAergic amacrine cells are direct targets of melatonin: immunocytochemical study of mt1 melatonin receptor in guinea pig retina. *Vis Neurosci.* 17(1): 63-70.
- Garbarino-Pico E, Carpentieri AR, Contin MA, Sarmiento MI, Brocco MA, Panzetta P, Rosenstein RE, Caputto BL, Guido ME. (2004) Retinal ganglion cells are autonomous circadian oscillators synthesizing N-acetylserotonin during the day. *J Biol Chem.* 279(49):51172-81.
- García-Valenzuela E, Shareef S, Walsh J, Sharma SC. (1995). Programmed cell death of retinal ganglion cells during experimental glaucoma. *Exp. Eye Res.* 61, 33-44.
- Gee KW, Bolger MB, Brinton RE, Coirini H, McEwen BS. (1988) Steroid modulation of the chloride ionophore in rat brain: structure-activity requirements, regional dependence and

mechanism of action. *J Pharmacol Exp Ther.* 246(2):803-12.

- Gillespie CF, Mintz EM, Marvel CL, Huhman KL, Albers HE. (1997) GABA(A) and GABA(B) agonists and antagonists alter the phase-shifting effects of light when microinjected into the suprachiasmatic region. *Brain Res.* 759(2):181-9.
- Godeau JF, Schorderet-Slatkine S, Hubert P, Baulieu EE. (1978) Induction of maturation in *Xenopus laevis* oocytes by a steroid linked to a polymer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 75(5):2353-7.
- Godley BF, Wurtman RJ. (1988) Release of endogenous dopamine from the superfused rabbit retina in vitro: effect of light stimulation. *Brain Res.* 452(1-2):393-5.
- Golombek DA, Ralph MR. (1994) Inhibition of GABA transaminase enhances light-induced circadian phase delays but not advances. *J Biol Rhythms.* 9(3-4):251-61.
- Gottlieb DI. (1988) GABAergic neurons. *Scientific American*, 258, 82-90.
- Gottlob I, Schneider E, Heider W, Skrandies W. (1987) Alteration of visual evoked potentials and electroretinograms in Parkinson's disease. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 66, 349-357.
- Gottlob I, Wundsch L, Pflug R. (1985) Possible role of amacrine cells in the generation of the mammalian ERG b-wave. *Doc Ophthalmol.* 61, 55-63.
- Gottlob I, Wundsch L, Tuppy FK. (1988) The rabbit electroretinogram: effect of GABA and its antagonists. *Vision Res.* 28, 203-210.

- Grace MS, Cahill GM, Besharse JC. (1991) Melatonin deacetylation: retinal vertebrate class distribution and *Xenopus laevis* tissue distribution. *Brain Res.* 559(1):56-63.
- Grace MS, Wang LM, Pickard GE, Besharse JC, Menaker M. (1996) The *tau* mutation shortens the period of rhythmic photoreceptor outer segment disk shedding in the hamster. *Brain Res.* 735(1):93-100.
- Grozdanic SD, Betts DM, Sakaguchi DS, Allbaugh RA, Kwon YH, Kardon RH (2003). Laser-induced mouse model of chronic ocular hypertension. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 44(10):4337-46.
- Grunert U, Wässle H. (1990) GABA-like immunoreactivity in the macaque monkey retina: a light and electron microscopic study. *J Comp Neurol.* 297(4):509-24.
- Guarneri P, Guarneri R, Cascio C, Piccoli F, Papadopoulos V. (1995) gamma-Aminobutyric acid type A/benzodiazepine receptors regulate rat retina neurosteroidogenesis. *Brain Res.* 683, 65-72.
- Guarneri P, Guarneri R, Cascio C, Pavasant P, Piccoli F, Papadopoulos V. (1994). Neurosteroidogenesis in rat retinas. *J Neurochem.* 63, 86-96
- Guinjoan, S.M., Golombek, D.A., Kanterewicz, B.I., Rosenstein, R.E. y Cardinali, D.P. (1992) *Neuroendocrinology Letters*, 14 No 5
- Gurevich L, Slaughter MM. (1993) Comparison of the waveforms of the ON bipolar neuron and the b-wave of the electroretinogram. *Vision Res.* 33, 2431-2435.

- Hamm H.E. and Menaker M. (1980) Retinal rhythms in chicks- circadian variation in melatonin and serotonin N-acetyltransferase activity. *Proc.Natl. Acad.Sci. USA.* 77, 4998-5002.
- Harding GF, Robertson KA, Edson AS, Barnes P, Wild J (1998) Visual electrophysiological effect of a GABA transaminase blocker. *Doc Ophthalmol*; 97: 179-188.
- Harding GF, Wild JM, Robertson KA, Rietbrock S, Martinez C. (2000) Separating the retinal electrophysiologic effects of vigabatrin: treatment versus field loss. *Neurology*; 55: 347-352.
- Hardus P, Verduin W, Berendschot T, Postma G, Stilma J, van Veelen C. (2003) Vigabatrin: longterm follow-up of electrophysiology and visual field examinations. *Acta Ophthalmol Scand.* 81, 459-465.
- Harney SC, Frenguelli BG, Lambert JJ. (2003) Phosphorylation influences neurosteroid modulation of synaptic GABA_A receptors in rat CA1 and dentate gyrus neurones. *Neuropharmacology.* 45, 873-83.
- Harris RA, Allan AM. (1985) Functional coupling of gamma-aminobutyric acid receptors to chloride channels in brain membranes. *Science.* 228(4703):1108-10.
- Harrison NL, Simmonds MA. (1984) Modulation of the GABA receptor complex by a steroid anaesthetic. *Brain Res.* 323(2):287-92.
- Hendrickson A, Ryan M, Noble B, Wu JY. (1985) Colocalization of [3H]muscimol and antisera to GABA and glutamic acid decarboxylase within the same neurons in monkey retina. *Brain Res.* 348(2):391-6.

- Hofmann HD, Möckel V. (1991) Release of gamma-amino[3H]butyric acid from cultured amacrine-like neurons mediated by different excitatory amino acid receptors. *J Neurochem.* 56(3):923-32.
- Hu ZY, Bourreau E, Jung-Testas I, Robel P, Baulieu EE. (1987) Neurosteroids: oligodendrocyte mitochondria convert cholesterol to pregnenolone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84(23):8215-9.
- Im WB, Blakeman DP, Davis JP, Ayer DE. (1990) Studies on the mechanism of interactions between anesthetic steroids and gamma-aminobutyric acidA receptors. *Mol Pharmacol.* 37(3):429-34.
- Irwin RP, Maragakis NJ, Rogawski MA, Purdy RH, Farb DH, Paul SM.. (1992) Pregnenolone sulfate augments NMDA receptor mediated increases in intracellular Ca^{2+} in cultured rat hippocampal neurons. *Neurosci Lett.* 141, 30-34.
- Iuvone PM, Besharse JC. (1986) Dopamine receptor-mediated inhibition of serotonin N-acetyltransferase activity in retina. *Brain Res.* 369(1-2):168-76.
- Iuvone PM, Chong NW, Bernard M, Brown AD, Thomas KB, Klein DC. (1999) Melatonin biosynthesis in chicken retina. Regulation of tryptophan hydroxylase and arylalkylamine N-acetyltransferase. *Adv Exp Med Biol.* 460:31-41
- Iuvone PM, Gan J, Avendano G. (1991) K^{+} -evoked depolarization stimulates cyclic AMP accumulation in photoreceptor-enriched cell cultures: role of calcium influx through dihydropyridine-sensitive calcium channels. *J. Neurochem.* 57, 615-621.

- Iuvone PM. (1986) Evidence for a D2 dopamine receptor in frog retina that decreases cyclic AMP accumulation and serotonin N-acetyltransferase activity. *Life Sci.* 38(4):331-42.
- Ivanova TN, Iuvone PM. (2003) Melatonin synthesis in retina: circadian regulation of arylalkylamine N-acetyltransferase activity in cultured photoreceptor cells of embryonic chicken retina. *Brain Res.* 973(1):56-63.
- Iwamori M, Moser HW, Kishimoto Y. (1976) Steroid sulfatase in brain: comparison of sulfohydrolase activities for various steroid sulfates in normal and pathological brains, including the various forms of metachromatic leukodystrophy. *J Neurochem.* 27(6):1389-95.
- Jaliffa CO, Lacoste FF, Llomovatte DW, Sarmiento MI, Rosenstein RE. (2000) Dopamine decreases melatonin content in golden hamster retina. *J Pharmacol Exp Ther.* 293(1):91-5.
- Johnson J, Chen TK, Rickman DW, Evans C, Brecha NC. (1996) Multiple gamma-Aminobutyric acid plasma membrane transporters (GAT-1, GAT-2, GAT-3) in the rat retina. *J Comp Neurol.* 375 (2):212-24.
- Johnson MA, Krauss GL, Miller NR, Medura M, Paul SR. (2000). Visual function loss from vigabatrin: effect of stopping the drug. *Neurology.* 55: 40-45.
- Johnson MA, Vardi N. (1998) Regional differences in GABA and GAD immunoreactivity in rabbit horizontal cells. *Vis Neurosci.* 15, 743-753.
- Jönsson U, Lundstrom M, Sellstrom A, Ehinger B. (1986) Calcium-independent release of gamma-aminobutyrate from nerve processes in the developing rabbit retina. *Neuroscience.*; 17(4):1235-41.

- Jurgens I, Matheu A, Castilla M. (1997) Ocular hypertension after cataract surgery: a comparison of three surgical techniques and two viscoelastics. *Ophthalmic Surg Lasers*; 28(1):30-36).
- Kalloniatis M. y Tomisich G. (1999) Amino Acid Neurochemistry of the Vertebrate Retina. *Progress in Retinal and Eye Research* Vol. 18, No. 6, pp. 811 to 866,
- Kalviainen R, Nousiainen I, Mantyjarvi, Nikoskelainen E, Partanen J, Partanen K, Riekkinen P Sr. (1999). Vigabatrin, a GABAergic antiepileptic drug, causes concentric visual field defects. *Neurology*. 53: 922-926.
- Kamermans M, Kraaij D, Spekreijse H. (2001) The dynamic characteristics of the feedback signal from horizontal cells to cones in the goldfish retina. *J Physiol*. 534(Pt. 2):489-500.
- Kamermans M, Spekreijse H. (1999) The feedback pathway from horizontal cells to cones. A mini review with a look ahead. *Vision Res*. 39(15):2449-68.
- Kamp CW, Morgan WW. (1980) Some barbiturates enhance the effect of muscimol on dopamine turnover in the rat retina. *J Pharmacol Exp Ther*. 213(2):332-6.
- Kaneko A, Tachibana M. (1986) Effects of gamma-aminobutyric acid on isolated cone photoreceptors of the turtle retina. *J Physiol*. 373:443-61.
- Kanterewicz BI, Golombek D, Rosenstein RE, Cardinali DP. (1993) Diurnal changes of GABA turnover rate in brain and pineal of syrian hamsters. *Brain Res. Bull*. 31, 661-666.
- Kanterewicz BI, Rosenstein RE, Golombek DA, Yannielli PC, Cardinali DP. (1995). Daily

variation in GABA receptor function in syrian hamster cerebral cortex. *Neurosci. Lett.* 200, 211-213.

- Kapousta-Bruneau NV. (2000) Opposite effects of GABA(A) and GABA(C) receptor antagonists on the b-wave of ERG recorded from the isolated rat retina. *Vision Res.* 40, 1653-1665.
- Kazula A., Nowak J.Z., and Iuvone P.M. (1993) Regulation of melatonin and dopamine biosynthesis in chick retina: The role of GABA. *Visual Neurosci.* 10, 621-629.
- Klein DC, Coon SL, Roseboom PH, Weller JL, Bernard M, Gastel JA, Zatz M, Iuvone PM, Rodriguez IR, Begay V, Falcon J, Cahill GM, Cassone VM, Baler R. (1997) The melatonin rhythm-generating enzyme: molecular regulation of serotonin N-acetyltransferase in the pineal gland. *Recent Prog Horm Res.* 52:307-57
- Knepper PA, Farbman AI, and Telser A. (1981). Aqueous outflow pathway glycosaminoglycans. *Exp. Eye Res.* 32 (3): 265-277.
- Knepper PA, Farbman AI, Telser AG. (1984) Exogenous hyaluronidases and degradation of hyaluronic acid in the rabbit eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 25(3):286-93.
- Kokate TG, Juhng KN, Kirkby RD, Llamas J, Yamaguchi S, Rogawski MA. (1999) Convulsant actions of the neurosteroid pregnenolone sulfate in mice. *Brain Res.* 831(1-2):119-24.
- Koksma JJ, van Kesteren RE, Rosahl TW, Zwart R, Smit AB, Luddens H, Brussaard AB. (2003) Oxytocin regulates neurosteroid modulation of GABA(A) receptors in supraoptic

nucleus around parturition. *J Neurosci.* 23, 788-797.

- Korenbrot JJ, Fernald RD. (1989) Circadian rhythm and light regulate opsin mRNA in rod photoreceptors. *Nature* 337 (2), 454-457.
- Kosaka T, Kosaka K, Nagatsu L, Wu J, Ottersen O, Hama K. (1987) Catecholaminergic neurons containing GABA-like and/or glutamic acid decarboxylase-like immunoreactivities in various brain regions of the rat. *Exp. Brain Res.* 66,191-210,
- Krauss GL, Johnson MA, Miller NR. (1998). Vigabatrin-associated retinal cone system dysfunction: electroretinogram and ophthalmologic findings. *Neurology*; 50: 614-618.
- Kurysheva, NI, Vinetskaia MI, Elichev VP, Demchuk, ML, Kuryshev, SI. (1996). Contribution of free-radical reactions of chamber humor to the development of primary open-angle glaucoma. *Vestn Oftalmol.* 112:3-5
- Lam, D., Lasater, E. and Naka, K. (1978) gamma-Aminobutyric acid: a neurotransmitter candidate for cone horizontal cells of the catfish retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75, 6310-6313.
- Lambert JJ, Belelli D, Peden DR, Vardy AW, Peters JA. (2003). Neurosteroid modulation of GABAA receptors *Prog Neurobiol.* 71, 67-80.
- Lau KC, So KF, Tay D, Leung MC. (1994) NADPH-diaphorase neurons in the retina of the hamster. *J Comp Neurol.* 350(4):550-8.
- Lawden MC, Eke T, Degg C, Harding GF, Wild JM. (1999). Visual field defects associated

with vigabatrin therapy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 67: 716-722

- Le Goascogne C, Robel P, Guezou M, Sananes N, Baulieu EE, Waterman M. (1987) Neurosteroids: cytochrome P-450_{scc} in rat brain. *Science*. 237(4819):1212-5.
- Lerner AB, Case JD, Mori W, Wright MR. (1959) Melatonin in peripheral nerve. *Nature*. 183:1821.
- Levkovitch-Verbin H, Martin KR, Quigley HA, Baumrind LA, Pease ME, Valenta D. (2002). Measurement of amino acid levels in the vitreous humor of rats after chronic intraocular pressure elevation or optic nerve transection. *J Glaucoma*. 11(5):396-405.
- Li GL, Li P, Yang XL. (2001). Melatonin modulates gamma-aminobutyric acid(A) receptor-mediated currents on isolated carp retinal neurons. *Neurosci Lett*. 301(1):49-53
- Li P, Pang SF y Tsang CW. (1997) Retinal 5-methoxytryptamine and 5-methoxyindole-3-acetic acid in the rat and quail: diurnal rhythms and interspecies differences. *Biochem Biophys Res Comm.*, 239: 353-356.
- Lipton SA. (1989) GABA-activated single channel currents in outside-out membrane patches from rat retinal ganglion cells. *Vis Neurosci*. 3(3):275-9.
- Lowrey PL, Shimomura K, Antoch MP, Yamazaki S, Zemenides PD, Ralph MR, Menaker M, Takahashi JS. (2000) Positional syntenic cloning and functional characterization of the mammalian circadian mutation tau. *Science*.; 288(5465):483-92.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. (1951) Protein measurement with the Folin

Phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.

- Maione S, Berrino L, Vitagliano S, Leyva J, Rossi F. (1992) Pregnenolone sulfate increases the convulsant potency of N-methyl-D-aspartate in mice. *Eur J Pharmacol.* 219, 477-479.
- Majewska MD, Bisslerbe JC, Eskay RL. (1985) Glucocorticoids are modulators of GABAA receptors in brain. *Brain Res.* 339(1):178-82.
- Majewska MD, Harrison NL, Schwartz RD, Barker JL, Paul SM. (1986) Steroid hormone metabolites are barbiturate-like modulators of the GABA receptor. *Science.* 232(4753):1004-7.
- Majewska MD, Mienville JM, Vicini S. (1988) Neurosteroid pregnenolone sulfate antagonizes electrophysiological responses to GABA in neurons. *Neurosci Lett.* 90(3):279-84.
- Majewska MD, Schwartz RD. (1987) Pregnenolone-sulfate: an endogenous antagonist of the gamma-aminobutyric acid receptor complex in brain? *Brain Res.* 404(1-2):355-60.
- Majewska MD. (1992) Neurosteroids: endogenous bimodal modulators of the GABAA receptor. Mechanism of action and physiological significance. *Prog Neurobiol.* 38(4):379-95.
- Maley B, Elde R. (1982) The ultrastructural localization of serotonin immunoreactivity within the nucleus of the solitary tract of the cat. *J Neurosci.* 2 (10):1499-506.
- Marc RE, Liu W. (2000) Fundamental GABAergic amacrine cell circuitries in the retina: nested feedback, concatenated inhibition, and axosomatic synapses. *J Comp Neurol.* 425(4):560-82.

- Marc RE, Liu WL, Kalloniatis M, Raiguel SF, van Haesendonck E. (1990) Patterns of glutamate immunoreactivity in the goldfish retina. *J Neurosci.* 10(12):4006-34.
- Marques N., Golombek D. y Moreno C. (1997) En: *Cronobiología, principios y aplicaciones.* Capítulo 3: Adaptación temporal. 1º Edición Editorial Universitaria de Buenos Aires, Argentina. (Eds: Marques N., Menna-Barreto L., Golombek D)
- Martinez C, Noack H. (1997). *The risk of visual field defects and the use of vigabatrin.* Denham: Hoechst Marion Roussel
- Masland RH. (2001) The fundamental plan of the retina. *Nat Neurosci.* 4(9):877-86.
- Massey S. (1991) En *Prog. in Ret Res.* Osborne and Chader (eds.), England. Pergamon Press. 9, 399-425.
- Massey SC y Redburn DA. (1987) Transmitter circuits in the vertebrate retina. *Prog Neurobiol.* 28, 55-96.
- Mathis C, Paul SM, Crawley JN. (1994) The neurosteroid pregnenolone sulfate blocks NMDA antagonist-induced deficits in a passive avoidance memory task. *Psychopharmacology (Berl).* 116, 201-206.
- Mauri-Llerda JA, Iniguez C, Tejero-Juste C, Santos-Lasaosa S, Escalza-Cortina I, Ascaso-Puyuelo J, Abad-Alegria F, Morales-Asin F. (2000) Visual field changes secondary to vigabatrin treatment. *Rev. Neurol.* 31: 1104-1108.
- Mayo W, George O, Darbra S, Bouyer JJ, Vallee M, Darnaudery M, Pallares M, Lemaire-

Mayo V, Le Moal M, Piazza PV, Abrous N, (2003) Individual differences in cognitive aging: implication of pregnenolone sulfate. *Prog Neurobiol.* 71, 43-48.

- McDonagh J, Stephen LJ, Dolan F M, Parks S, Dutton GN, Kelly K, Keating D, Sills GJ, Brodie MJ. (2003) Peripheral retinal dysfunction in patients taking vigabatrin. *Neurology* 61, 1690-1694.
- McGoogan JM, Cassone VM. (1999) Circadian regulation of chick electroretinogram: effects of pinealectomy and exogenous melatonin. *Am J Physiol.* 277(5 Pt 2):R1418-27.
- Mehta AK, Ticku MK. (1999) An update on GABAA receptors. *Brain Res Brain Res Rev.* 29(2-3):196-217.
- Meyer DA, Carta M, Partridge LD Covey DF, Valenzuela CF. (2002) Neurosteroids enhance spontaneous glutamate release in hippocampal neurons. Possible role of metabotropic sigma1-like receptors. *J Biol Chem.* 277, 28725-28732.
- Midelfart A, Midelfart E, Brodtkorb E. (2000). Visual field defects in patients taking vigabatrin. *Acta Ophthalmol Scand;* 78: 580-584.
- Mienville JM, Vicini S. (1989) Pregnenolone sulfate antagonizes GABAA receptor-mediated currents via a reduction of channel opening frequency. *Brain Res.* 489(1):190-4.
- Miller L, Stier M, Lovenberg W. (1980) Evidence for the presence of N-acetyl transferase in rat retina. *Comp Biochem Physiol C.* 66(2):213-6.
- Miranda-Anaya M, Bartell PA, Menaker M. (2002) Circadian rhythm of iguana

electroretinogram: the role of dopamine and melatonin. *J Biol Rhythms*. 17(6):526-38.

- Mitchell CK, Redburn DA. (1991) Melatonin inhibits ACh release from rabbit retina. *Vis Neurosci*. 7(5):479-86.
- Moore C, Milne S, Morrison JC (1993) A rat model of pressure-induced optic nerve damage *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 34 (4), 1141
- Moore CG, Epley D, Milne ST, Morrison JC. (1995). Long-term non-invasive measurement of intraocular pressure in the rat eye. *Curr Eye Res*. 14:711-717.
- Moore RY y Card JP. (1994) Intergeniculate leaflet: an anatomically functionally distinct subdivision of the lateral geniculate complex. *J. Comp. Neurol*. 344 (3), 403-430.
- Moore RY y Speh JC. (1993) GABA is the principal neurotransmitter of the circadian system. *Neurosci. Lett*. 150 112-116.
- Moore RY. (1993) Organization of the primate circadian system. *J Biol Rhythms*. 8 Suppl:S3-9.
- Moreno MC, Campanelli J, Sande P, Sanz DA, Keller Sarmiento MI, Rosenstein RE. (2004). Retinal oxidative stress induced by high intraocular pressure. *Free Radic Biol Med*. 37(6):803-12.
- Moreno MC, Sande P., Aldana Marcosa, de Zavalía N, Keller Sarmiento MI, Rosenstein RE (2005) Effect of glaucoma on the retinal glutamate/glutamine cycle activity. *FASEB Journal* (en prensa)

- Morrison JC, Nylander KB, Lauer AK, Cepurna WO, Johnson E. (1998) Glaucoma drops control intraocular pressure and protect optic nerves in a rat model of glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 39(3):526-31.
- Mosinger JL y Yazulla S. (1985) Colocalization of GAD-like immunoreactivity and 3H-GABA uptake in amacrine cells of rabbit retina. *J Comp Neurol.* 240(4):396-406.
- Mukai S, Mishima HK, Shoge K, Shinya M, Ishihara K, Sasa M. (2002) Existence of ionotropic glutamate receptor subtypes in cultured rat retinal ganglion cells obtained by the magnetic cell sorter method and inhibitory effects of 20-hydroxyecdysone, a neurosteroid, on the glutamate response. *Jpn J Pharmacol.* 89, 44-52.
- Murakami M, Shimoda Y, Nakatani K, Miyachi E, Watanabe S. (1982 a) GABA-mediated negative feedback from horizontal cells to cones in carp retina. *Jpn J Physiol.* 32(6):911-26.
- Murakami M, Shimoda Y, Nakatani K, Miyachi E, Watanabe S. (1982 b) GABA-mediated negative feedback and color opponency in carp retina. *Jpn J Physiol.* 32(6):927-35.
- Naarendorp F, Hitchcock PF, Sieving PA. (1993) Dopaminergic modulation of rod pathway signals does not affect the scotopic ERG of cat at dark-adapted threshold. *J Neurophysiol.* 70, 1681-1691.
- Naarendorp F, Sieving PA. (1991) The scotopic threshold response of the cat ERG is suppressed selectively by GABA and glycine. *Vision Res.* 31, 1-15.
- Nakamura Y, McGuire B, Sterling, P. (1980) Interplexiform cell in cat retina: identification by uptake of gamma-[3H]aminobutyric acid and serial reconstruction. *Proc. Natl. Acad. Sci.*

USA.; 77, 658-661.

- Nao-i N, Nilsson SE, Gallemore RP, Steinberg RH. (1989) Effects of melatonin on the chick retinal pigment epithelium: membrane potentials and light-evoked responses. *Exp Eye Res.*; 49(4):573-89.
- Naum O G, Fernanda Rubio M, Golombek DA. (2001) Rhythmic variation in gamma-aminobutyric acid(A)-receptor subunit composition in the circadian system and median eminence of Syrian hamsters. *Neurosci Lett.*; 310(2-3):178-82.
- Neal MJ y Shah MA. (1990) Development of tolerance to the effects of vigabatrin (gamma-vinyl-GABA) on GABA release from rat cerebral cortex, spinal cord and retina. *Br J Pharmacol.* 100: 324-328.
- Neal MJ, Cunningham JR, Hutson PH, Semark JE. (1992) Calcium dependent release of acetylcholine and gamma-aminobutyric acid from the rabbit retina. *Neurochem Int.* 20(1):43-53.
- Neal MJ, Cunningham JR, Shaha M. (1989) Excitatory aminoacid and transmitter release in the retina. *Neurochemistry international.* 14, 407-412
- Nelson N. (1998) The Family of Na⁺ / Cl⁻ Neurotransmitter Transporters *J. Neurochem.* 71, 1785-1803.
- Nicholls DG. (1989) Release of glutamate, aspartate, and gamma-aminobutyric acid from isolated nerve terminals. *J Neurochem.* 52(2):331-41.

- Niki T, Hamada T, Ohtomi M, Sakamoto K, Suzuki S, Kako K, Hosoya Y, Horikawa K, Ishida N. (1998) The localization of the site of arylalkylamine N-acetyltransferase circadian expression in the photoreceptor cells of mammalian retina. *Biochem Biophys Res Commun.* 248(1):115-20
- Nowak JZ, Zurawska E, Zawilska J. (1989) Melatonin and its generating system in vertebrate retina: circadian rhythm, effect of environmental lighting and interaction with dopamine. *Neurochem Int.* 14, 397-406.
- Olsen, R. W. and Tobin, A. (1990) Molecular biology of GABAA receptors. *FASEB J.* 4, 1469-1480.
- O'Malley DM, Masland RH. (1989) Co-release of acetylcholine and gamma-aminobutyric acid by a retinal neuron. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86(9):3414-8.
- Orchinik M. y Mc Ewen B. (1993) Novel and classical actions of neuroactive steroids. *Neurotransmissions* 9:1-6. Research Biochemicals Incorporated (RBI).
- Osborne N, Patel S, Beaton D, Neuhoff V. (1986) GABA neurones in retinas of different species and their postnatal development in situ and in culture in the rabbit retina. *Cell Tissue Res.* 243, 117-123,
- Osborne NN, Ugarte M, Chao M, Chidlow G, Bae JH, Wood JP, Nash MS. (1999). Neuroprotection in relation to retinal ischemia and relevance to glaucoma *Surv. Ophthalmol.*, 1, 102-28.
- Pasik P, Pasik T, Saavedra JP. (1982) Immunocytochemical localization of serotonin at the

ultrastructural level. *J Histochem Cytochem.* 30(8):760-4.

- Pei F, Yue BYJT, Tso MOM. (1984) Effect of chronic intracameral injections of chondroitin sulfate on cat eyes. *Graefes Arch. Ophthalmol.*; 222: 1-8
- Peters JA, Kirkness EF, Callachan H, Lambert JJ, Turner AJ. (1988) Modulation of the GABAA receptor by depressant barbiturates and pregnane steroids. *Br J Pharmacol.* 94(4):1257-69.
- Pickel VM, Reis DJ, Leeman SE. (1977) Ultrastructural localization of substance P in neurons of rat spinal cord. *Brain Res.* 122(3):534-40.
- Pierce ME, Besharse JC. (1987) Melatonin and rhythmic photoreceptor metabolism: melatonin-induced cone elongation is blocked at high light intensity. *Brain Res.* 405(2):400-4.
- Pierce ME, Besharse JC. (1988) Circadian regulation of retinomotor movements: II. The role of GABA in the regulation of cone position. *J Comp Neurol.* 270(2):279-87.
- Pinto FT, Golombek DA. (1999) Neuroactive steroids alter the circadian system of the Syrian hamster in a phase-dependent manner. *Life Sci.* 65(23):2497-504.
- Pittendrigh CS. (1960) Circadian rhythms and the circadian organization of living systems. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 25:159-84.
- Pittendrigh CS. (1965) On the biological problems to be attacked with a series of U.S. satellites in 1966. *Life Sci Space Res.* 3:206-14.

- Pittendrigh CS. (1993) Temporal organization: reflections of a Darwinian clock-watcher. *Annu Rev Physiol.* 55:16-54.
- Ponjavic V, Granse L, Kjellstrom S, Andreasson S, Bruun A. (2004). Alterations in electroretinograms and retinal morphology in rabbits treated with vigabatrin. *Doc Ophthalmol.* 108(2):125-133.
- Popova E. (2003) Effects of benzodiazepines on frog ERG. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 134, 457-464.
- Pourcho RG, Goebel DJ. (1983) Neuronal subpopulations in cat retina which accumulate the GABA agonist, (3H)muscimol: a combined Golgi and autoradiographic study. *J Comp Neurol.* 219(1):25-35.
- Prasad AN, Penney S, Buckley DJ. (2001) The role of vigabatrin in childhood seizure disorders: results from a clinical audit. *Epilepsia.* 42, 54-61.
- Puia G., Ducic I., Vicini S., Costa E. (1993) Does neurosteroid modulatory efficacy depend on GABAA receptor subunit composition? *Receptors Channels.* 1, 135-142.
- Qian H, Dowling JE. (1994) Pharmacology of novel GABA receptors found on rod horizontal cells of the white perch retina. *J Neurosci.* 14(7):4299-307.
- Quigley HA. (1999) Neuronal death in glaucoma. *Prog. Retin. Eye Res.* 18,1, 39-57.
- Rager G. (1979) The cellular origin of the b-wave in the electroretinogram - a developmental approach. *J Comp Neurol.* 188, 225-244.

- Ralph MR, Menaker M. (1986) Effects of diazepam on circadian phase advances and delays. *Brain Res.* 372(2):405-8.
- Reddy DS. (2003) Pharmacology of endogenous neuroactive steroids. *Crit Rev Neurobiol.* 15, 197-234.
- Reiter RJ, Ortiz GG, Gaia Monti M, Carneiro RC. (1997) Cellular and molecular actions of melatonin as an antioxidant. En: Maetroni, G. J. M.; Conti, A.; Reiter, R. J., eds. *Therapeutic Potential of Melatonin.* Front Horm Res. Basel: Karger 81-88.
- Reiter RJ, Tan DX, Mayo JC, Sainz RM, Leon J, Czarnocki Z. (2003). Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans. *Acta Biochim Pol.* 50(4):1129-46
- Reiter RJ. (1995). Functional pleiotropy of the neurohormone melatonin: antioxidant protection and neuroendocrine regulation. *Front. Neuroendocrinol.* 16:383-415.
- Remé CE, Wirz-Justice A, Terman M. (1991) The visual input stage of the mammalian pacemaking system: I. Is there a clock in the mammalian eye? *J. Biol. Rhythm* 6, 5-29.
- Reppert SM, Godson C, Mahle CD, Weaver DR, Slaugenhaupt SA, Gusella JF. (1995) Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel1b melatonin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 92(19):8734-8.
- Reppert SM, Sagar SM. (1983) Characterization of the day-night variation of retinal melatonin content in the chick. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 24(3):294-300.

- Reppert SM, Weaver DR. (2002) Coordination of circadian timing in mammals. *Nature*. 418(6901):935-41.
- Robel P, Baulieu EE. (1994) Neurosteroids: biosynthesis and function. En: *Neurobiology of steroids: methods in the neurosciences*, (Kloet R, Sutanto W, eds), Vol. 22, pp 36-50. Academic Press, San Diego.
- Roberts E. (1986) What do GABA neurons really do? They make possible variability generation in relation to demand. *Exp Neurol*. 93(2):279-90.
- Robson JG, Frishman LJ (1995) Response linearity and kinetics of the cat retina: the bipolar cell component of the dark-adapted electroretinogram. *Visual Neuroscience* 12, 837-850.
- Rosenstein RE, Cardinali DP. (1986) Melatonin increases in vivo GABA accumulation in rat hypothalamus, cerebellum, cerebral cortex and pineal gland. *Brain Research*. 398: 403-406.
- Rosenstein RE, Cardinali DP. (1990). Central GABAergic mechanism as a target for melatonin activity in brain. *Neurochemistry International* 17: 373-379.
- Rosenstein RE, Dubocovich ML (2001) Characterization of 2-[125I]- Iodomelatonin binding sites in the golden hamster retina by autoradiography. *Biological Rhythm Research* 32,191-200,
- Rosenstein RE, Estevez AG, Cardinali DP. (1989). Time-dependent effect of melatonin on glutamic acid decarboxylase activity and ³⁶Cl⁻ uptake in rat hypothalamus. *Journal of Neuroendocrinology* 1: 443-447.

- Rossi DJ, Hamann M, Attwell D. (2003) Multiple modes of GABAergic inhibition of rat cerebellar granule cells. *J Physiol.* 548(Pt 1):97-110. Epub 2003 Feb 14.
- Rupprecht R, Holsboer F. (1999) Neuroactive steroids: mechanisms of action and neuropsychopharmacological perspectives. *Trends Neurosci.* 22, 410-416.
- Saenz DA, Goldin AP, Minces L, Chianelli M, Sarmiento MI, Rosenstein RE. (2004) Effect of melatonin on the retinal glutamate/glutamine cycle in the golden hamster retina. *FASEB J.*; 18(15):1912-3.
- Saenz DA, Turjanski AG, Sacca GB, Marti M, Doctorovich F, Sarmiento MI, Estrin DA, Rosenstein RE. (2002) Physiological concentrations of melatonin inhibit the nitridergic pathway in the Syrian hamster retina. *J Pineal Res.* 33(1):31-6.
- Sakamoto H, Ukena K, Tsutsui K. (2001). Activity and localization of 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/ Delta5-Delta4-isomerase in the zebrafish central nervous system. *J Comp Neurol.* 439(3):291-305.
- Scher J, Wankiewicz E, Brown GM, Fujieda H. (2003) AII amacrine cells express the MT1 melatonin receptor in human and macaque retina. *Exp Eye Res.* 77(3):375-82.
- Schumacher M. (1990) Rapid membrane effects of steroid hormones: an emerging concept in neuroendocrinology. *Trends Neurosci.* 13(9):359-62.
- Schwartz EA. (1982) Calcium-independent release of GABA from isolated horizontal cells of the toad retina. *J Physiol.*; 323:211-27.

- Schwartz EA. (1987) Depolarization without calcium can release gamma-aminobutyric acid from a retinal neuron. *Science*. 238(4825):350-5.
- Schwartz EA. (2002) Transport-mediated synapses in the retina. *Physiol Rev*. 82(4):875-91.
- Segawa K. (1975) Electron microscopic studies on primary open angle glaucomatous eyes: extracellular materials in the trabecular meshwork. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi*. 79(11):1665-86.
- Seyle H. (1941) Anaesthetic effects of steroid hormones. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 46:116
- Seyle H. (1942) The antagonism between anesthetic steroid hormones and pentamethylenetetrazol (metrazol). *Lab. Clin. Med.*, 27:1051
- Shareef SR, Garcia-Valenzuela E, Salierno A, Walsh J, Sharma SC. (1995). Chronic ocular hypertension following episcleral venous occlusion in rats. *Exp Eye Res*; 61(3):379-382
- Shibuya K, Takata N, Hojo Y, Furukawa A, Yasumatsu N, Kimoto T, Enami T, Suzuki K, Tanabe N, Ishii H, Mukai H, Takahashi T, Hattori TA, Kawato S. (2003) Hippocampal cytochrome P450s synthesize brain neurosteroids which are paracrine neuromodulators of synaptic signal transduction. *Biochim Biophys Acta*. 1619, 301-316.
- Sills GJ, Patsalos PN, Butler E, Forrest G, Ratnaraj N, Brodie MJ. (2001). Visual field constriction: Accumulation of vigabatrin but not tiagabine in the retina. *Neurology* 57: 196-200.
- Siu, AW, Reiter RJ, To CH. (1999) Pineal indoleamines and vitamin E reduce nitric oxide-

induced lipid peroxidation in rat retinal homogenates. *J Pineal Res.* 2:122-128;

- Somogyi P, Hodgson AJ, Chubb IW, Penke B, Erdei A. Antisera to gamma-aminobutyric acid. (1985) II. Immunocytochemical application to the central nervous system. *J Histochem Cytochem.*; 33(3):240-8.
- Stockton RA, Slaughter MM. (1989) B-wave of the electroretinogram. A reflection of ON bipolar cell activity. *J Gen Physiol.* 93, 101-122.
- Sullivan SD, Moenter SM. (2003) Neurosteroids alter gamma-aminobutyric acid postsynaptic currents in gonadotropin-releasing hormone neurons: a possible mechanism for direct steroidal control. *Endocrinology.* 144, 4366-4375.
- Takahata K, Katsuki H, Kume T, Ito K, Tochikawa Y, Muraoka S, Yoneda F, Kashii S, Honda Y, Akaike A. (2003) Retinal neurotoxicity of nitric oxide donors with different half-life of nitric oxide release: involvement of N-methyl-D-aspartate receptor. *Pharmacol Sci.* 92(4):428-432.
- Takatsuji K, Tohyama M. (1989) The organization of the rat geniculate body by immunohistochemical analysis of neuroactive substance. *Brain Res.* 480, 198-209.
- Taniyama K, Hashimoto S, Hanada S, Tanaka C. (1988) Benzodiazepines and barbiturate potentiate the pre- and postsynaptic gamma-aminobutyric acid (GABA)_A receptor-mediated response in the enteric nervous system of guinea pig small intestine. *J Pharmacol Exp Ther.* 245, 250-256.
- Tatton WG. (1999) Apoptotic mechanisms in neurodegeneration: possible relevance to

glaucoma. *Eur. J. Ophthalmol.* 9, 22-29.

- Teschemacher A, Kasparov S, Kravitz EA, Rahamimoff R. (1997) Presynaptic action of the neurosteroid pregnenolone sulfate on inhibitory transmitter release in cultured hippocampal neurons. *Brain Res.* 772, 226-232.
- Tessier-Lavigne M. (2001) En: *Principios de Neurociencia. Parte V: Percepción. Capítulo 26: El procesamiento de la información visual; 4ta Edición McGraw-Hill/Interamericana de España, S.A.U. Editores: Kandel E, Shwartz J y Jessell T.*
- Textorius O. y Nilsson SE. (1987) Effects of intraocular irrigation with melatonin on the c-wave of the direct current electroretinogram and on the standing potential of the eye in albino rabbits. *Doc Ophthalmol.* 65(1):97-111.
- Toggweiler S, Wieser HG. (2001). Concentric visual field restriction under vigabatrin therapy: extent depends on the duration of drug intake. *Seizure.* 10: 420-423.
- Tosini G, Fukuhara C (2002). The mammalian retina as a clock. *Cell Tissue Res.* 309(1):119-26.
- Tosini G, Menaker M. (1996) Circadian rhythm in cultured mammalian retina. *Science.* 272, 419-421.
- Tosini G, Menaker M. (1998) The clock in the mouse retina: melatonin synthesis and photoreceptor degeneration. *Brain Res.* 789(2):221-8.
- Tosini G. (2000) Melatonin circadian rhythm in the retina of mammals. *Chronobiol Int.;*

17(5):599-612.

- Turjanski AG, Rosenstein RE, Estrin DA. (1998) Reaction of melatonin and related indoles with free radicals: a computational study. *J Med Chem.* 41: 3684-3689
- Turjanski, AG, Leonik F, Rosenstein RE, et al. (2000) Scavenging of NO by Melatonin. *J Am Chem Soc.* 122:10468- 10469
- Turner DM, Ransom RW, Yang JS, Olsen RW. (1989) Steroid anesthetics and naturally occurring analogs modulate the gamma-aminobutyric acid receptor complex at a site distinct from barbiturates. *J Pharmacol Exp Ther.* 248(3):960-6.
- Ueda J, Sawaguchi S, Hanyu T, Yaoeda K, Fukuchi T, Abe H, Ozawa H. (1998). Experimental glaucoma model in the rat induced by laser trabecular photocoagulation after an intracameral injection of India ink. *Jpn J Ophthalmol.* 42(5):337-344
- Van der Heyden JAM, Korf J. (1978) Regional levels of GABA in the brain: Rapid semiautomated assay and prevention of postmortal increase by 3-mercaptopropionic acid. *J. Neurochem.* 31 197-203
- Vaney DI, Young HM. (1988) GABA-like immunoreactivity in NADPH-diaphorase amacrine cells of the rabbit retina. *Brain Res.* 474(2):380-5.
- Vicini S, Losi G, Homanics GE. (2002) GABA(A) receptor delta subunit deletion prevents neurosteroid modulation of inhibitory synaptic currents in cerebellar neurons. *Neuropharmacology.* 43, 646-50.

- Vigh J, Banvolgyi T, Wilhelm M. (2000) Amacrine cells of the anuran retina: morphology, chemical neuroanatomy, and physiology. *Microsc Res Tech.* 50(5):373-83
- Vivar C, Gutierrez R. (2005) Blockade of the membranal GABA transporter potentiates GABAergic responses evoked in pyramidal cells by mossy fiber activation after seizures. *Hippocampus.*
- Vivien-Roels, B., Pevet, P., Dubois, M., Arendt, J., and Brown, G. (1981) Immunohistochemical evidence for the presence of melatonin in the pineal gland, the retina and the Harderian gland. *Cell. Tiss. Res.* 217, 105-115.
- Vorwerk CK, Gorla MS, Dreyer EB. (1999). An experimental basis for implicating excitotoxicity in glaucomatous optic neuropathy. *Surv Ophthalmol.*; vol 43 No. 1: S142-50
- Waldmeier PC, Wicki P, Feldtrauer JJ, Baumann PA (1988) Potential involvement of a baclofen-sensitive autoreceptor in the modulation of the release of endogenous GABA from rat brain slices in vitro. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 337, 289-295.
- Wässle H, Chun MH. (1988) Dopaminergic and indoleamine-accumulating amacrine cells express GABA-like immunoreactivity in the cat retina. *J Neurosci.* 8(9):3383-94.
- Wässle H, Chun MJ. (1989) GABA-like immunoreactivity in the cat retina: light microscopy. *J. Comp. Neurol.* 279, 43-54.
- Weidenfeld J, Siegel RA, Chowers I. (1980) In vitro conversion of pregnenolone to progesterone by discrete brain areas of the male rat. *J Steroid Biochem.* 13(8):961-3

- Wen R, Oakley B 2nd. (1990) K(+)-evoked Müller cell depolarization generates b-wave of electroretinogram in toad retina. *Proc Natl Acad Sci USA*. 87, 2117-2121.
- Westbrook G. L. (2001) En: *Principios de Neurociencia*. Parte VII: Homeóstasis de la estimulación, la emoción y el comportamiento. Capítulo 46: Crisis Epilépticas y Epilepsias; 4^{ta} Edición McGraw-Hill/Interamericana de España, S.A.U. Editores: Kandel E, Shwartz J y Jessell T.
- Wiechman AF (1996) Hydroxyindole -O-methyltransferase mRNA expression in a subpopulation of photoreceptors in the chicken retina. *J. Pineal Res*. 20, 217-225.
- Wiechmann A.F (2003) Differential distribution of Mel1a and Mel1c melatonin receptors in *Xenopus laevis* retina. *Experimental Eye Research*. 76 99–106
- -Wiechmann AF, Hollyfield JG. (1989) HIOMT-like immunoreactivity in the vertebrate retina: a species comparison. *Exp Eye Res*. 49(6):1079-95.
- Wiechmann AF, Vrieze MJ, Dighe R, Hu Y. (2003) Direct modulation of rod photoreceptor responsiveness through a Mel(1c) melatonin receptor in transgenic *Xenopus laevis* retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 44(10):4522-31.
- Wu FS, Gibbs TT, Farb DH. (1990) Inverse modulation of gamma-aminobutyric acid- and glycine-induced currents by progesterone. *Mol Pharmacol*. 37, 597-602.
- Wu FS, Gibbs TT, Farb DH. (1991) Pregnenolone sulfate: a positive allosteric modulator at the N-methyl-D-aspartate receptor. *Mol Pharmacol*. 40(3):333-6.

- Wu SM. (1991) Input-output relations of the feedback synapse between horizontal cells and cones in the tiger salamander retina. *J Neurophysiol.* 65(5):1197-206.
- Wulle I, Schnitzer J. (1989) Distribution and morphology of tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons in the developing mouse retina. *Brain Res Dev Brain Res.* 48:59-72
- Yamazaki S, Alones V, Menaker M. (2002) Interaction of the retina with suprachiasmatic pacemakers in the control of circadian behavior. *J Biol Rhythms.* 17(4):315-29.
- Yang XL. (2004) Characterization of receptors for glutamate and GABA in retinal neurons. *Prog Neurobiol.* 73(2):127-50.
- Yazulla S, Cunningham J, Neal M. (1985) Stimulated release of endogenous GABA and glycine from the goldfish retina. *Brain Res.* 345(2):384-8.
- Yazulla S. (1986) Neurochemistry. Is GABA the neurotransmitter for some photoreceptors? *Nature.* 320, 685-686.
- Yeh HH, Lee MB, and Cheun JE. (1990) Properties of GABA-activated whole-cell current in bipolar of the rat retina. *Vis Neurosci.* 4, 349-357.
- Yue BYJT, Lin CCL, Fei PF, Tso MOM (1984). Effects of chondroitin sulfate on metabolism of trabecular meshwork. *Exp Eye Res.* 38: 35-44.
- Zawilska JB, Nowak JZ. (1992) Regulatory mechanisms in melatonin biosynthesis in retina. *Neurochem Int.* 20(1):23-36.

- Zeevalk GD, Nicklas WJ. (1992) Evidence that the loss of the voltage-dependent Mg²⁺ block at the N-methyl-D-aspartate receptor underlies receptor activation during inhibition of neuronal metabolism. *J Neurochem.* 59(4):1211-20.
- Zhang J, Li W, Trexler EB, Massey SC. (2002) Confocal analysis of reciprocal feedback at rod bipolar terminals in the rabbit retina. *J Neurosci.* 22(24):10871-82.