Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento del glaucoma

Belforte, Nicolás Adalberto

2011

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Belforte, Nicolás Adalberto. (2011). Desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento del glaucoma. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Belforte, Nicolás Adalberto. "Desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento del glaucoma". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2011.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento del glaucoma.

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área
CIENCIAS BIOLOGICAS

Autor: Licenciado Nicolás Adalberto Belforte.

Directora de tesis: Prof. Dra. Ruth Estela Rosenstein

Consejera de Estudios: Prof. Dra. Lidia Szczupak

Lugar de trabajo: Laboratorio de Neuroquímica Retiniana y Oftalmología Experimental, Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, UBA, CEFyBO-CONICET

Buenos Aires, 2011

Desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento del glaucoma.

Resumen

En este Trabajo de Tesis se demostró que la hipertensión ocular inducida por inyecciones semanales intracamerales de ácido hialurónico provocó un aumento significativo en la actividad del sistema nitrérgico retiniano. La melatonina moduló los sistemas glutamatérgico, GABAérgico, nitrérgico y antioxidante endógeno retinianos en forma opuesta a la inducida por la hipertensión ocular crónica. Un tratamiento crónico con melatonina disminuyó las alteraciones funcionales e histológicas provocadas por el glaucoma experimental. Hemos desarrollado un modelo de glaucoma experimental a través de la administración semanal de condroitín sulfato (CS) en la cámara anterior del ojo de rata que reproduce características centrales del glaucoma humano. La inducción de tolerancia isquémica provocó una preservación significativa en la función retiniana y en la estructura de la retina y del nervio óptico en ojos con hipertensión ocular inducida por la administración de CS. Asimismo, hemos demostrado que la neurotomía óptica radial, que no provocó daño per se, previno y redujo los cambios inducidos por el glaucoma experimental, tanto a nivel funcional como histológico.

Palabras claves: glaucoma, melatonina, condroitín sulfato, tolerancia isquémica, neurotomía óptica radial.

Development of new therapeutic strategies for glaucoma treatment.

Abstract

In this Thesis, we have demonstrated that ocular hypertension induced by weekly intracameral injections of hyaluronic acid provoked a significant increase in the retinal nitridergic pathway activity. Melatonin modulated the retinal glutamatergic, GABAergic, nitridergic and endogenous antioxidant systems in an opposite way to that induced by chronic ocular hypertension. Moreover, a chronic treatment with melatonin decreased functional and histological alterations provoked by experimental glaucoma. We have developed an experimental model of glaucoma in rats induced by weekly injections of chondroitin sulfate (CS) in the eye anterior chamber, which reproduces central features of human glaucoma. The induction of ischemic tolerance provoked a significant preservation of retinal function and retinal and optic nerve structure in eyes with ocular hypertension induced by CS. In addition, we have demonstrated that radial optic neurotomy, which did not cause damage per se, prevented and reduced functional and histological alterations in the retina induced by experimental glaucoma.

Key words: glaucoma, melatonin, chondroitin sulphate, ischemic tolerance, radial optic neurotomy.

AGRADECIMIENTOS

- A Ruth, porque sin su enorme ayuda y dirección no se hubiera podido terminar este trabajo. Por guiarme y enseñarme, en el transcurso de estos últimos años, en el vastísimo campo de la ciencia. Por tratar todo el tiempo de mejorar, perfeccionar y progresar, para que en un futuro sea un gran investigador (igual que ella). Por querer siempre lo mejor de mí, ya sea adentro como afuera del laboratorio. Y por muchas cosas más (recomendaciones, consejos, apoyo, etc), pero en particular por la paciencia que tuvo. Solamente, gracias…..Totales.
- A Moni, Inés y Dani (los viejos (con cariño, no se enojen, saben que yo los considero como chicos de 29 años, je) sabios del NROE) por estar siempre cuando uno necesita ayuda de lo más variado, desde el "alguien sabe donde quedó el cloruro de sodio" hasta "no me ayudas a hacer la bibliografía?" pasando por el medio en sus infinitos consejos previos al inicio de un experimento y estadística.
- A la muchachada del laboratorio (Pablito, Diego, Maga, Eze, Damián y Meli) por siempre dar una mano cuando uno lo pide y nunca poner un pero. Por las interminables charlas, comentarios, anécdotas e historias que hicieron del laboratorio como si fuera un hogar. Por todos los momentos compartidos por su buena compañía y por su amistad.
- A Pablito, en versión veterinario, por estar siempre dispuesto a darnos una mano en los malos momentos de Olaf (la mascota de laboratorio).
- A Ceci, por ayudarme en mis primero pasos en el laboratorio, por su alegría, camadería y por pasar momentos "inquietantes" en sus famosos interrogatorios antes de empezar en el laboratorio.
- A Hernán, por su infinita sabiduría en histología y por ser excelente compañía.
- A Isabel por su enorme ayuda en la preparación de los cortes histológicos y además por ser una excelente persona.

- A Cora y compañía, por el intercambio de drogas, yerba, herramientas y dudas sobre computación. Pero sobre todo por la amistad.
- A la Dra. Pasquini y su gente, por su ayuda en el “préstamo” de ideas y equipos.
- A Victoria, en el principio, y a Liber, en el final, por cuidar a los animales y por lograr que haya animales.
- A Ana Franchi y al CEFyBO, por darme una mano siempre que la necesité y por darme un lugar de trabajo.
- A mi familia. Todo esto no se hubiera logrado sin ellos. Todo lo que soy, es gracias a ellos. Siempre y por siempre estuvieron y estarán en todos los momentos de mi vida. A mi viejos (que siempre quisieron lo mejor de mí) y a mis hermanos (Guidito y Tomasito) solo quiero decirles gracias. No hay cantidad de palabras para transmitir mi deseo de agradecimiento hacia ustedes.
- A Guidito, Bea y a mi futuro sobrino o sobrina (es muy pronto para saber), por seguir creciendo la familia y por darme siempre su energía desde el otro lado del océano.
- A mi nueva familia, Irma y Ricardo por aceptarme en la familia y aceptar mis logros como si fueran suyos.
- A mis nuevos hermanos, Rami, Angie, Guada, Alfonso y Ceci. Por tantos buenos momentos que compartimos y compartiremos.
- A mis amigos, autodenominados “los ñoños”: al flaco, virja, juaju, marito, tritri, javi, marian, jime, tincho y fer. Hay tantas cosas para agradecerles. Interminables fines de semanas juntos estudiando, robando la comida del dueño de casa (un especial cariño a Beba y Dolly). Muchos veranos juntos en la biblioteca de la facultad preparando finales (que momentos….) y por sobre todo, y creo que hablo por todos ustedes, por su infinita paciencia para tratar de explicarme el dificilísimo mundo de la Ecología.

- A Pablito y Galle, por ser mis amigos desde hace mas de 15 años (o más). Por pasar los buenos y malos juntos. Por pasar tardes y noches, los tres tocando la guitarra y escuchando buena música. Por el famoso asado en Alvarez, que nunca se realizó.
- A la Universidad de Buenos Aires y al CONICET, por las becas que me otorgaron para la realización de este trabajo de doctorado.
- Al Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, por brindarme un ámbito propicio para realizar mi trabajo de Tesis
- Y por último y especialmente a Nuri, por tener toda la paciencia del mundo en aguantarme y principalmente por estar al lado mío. Por estresarme, porque ella está estresada, por hacerme feliz cada día que pasa y por sobre todo porque al lado de ella no existe más la tristeza, soledad, días nublados o aburridos.

- A mis viejos

- Al NROE

“ En el fondo era como si todos estuviesen presintiendo o hasta descubriendo que, así como el amor es ciego, la amistad es entender hasta lo que uno no entiende de sus amigos y perdonarles absolutamente todo, aunque joda.”

Alfredo Bryce Echenique

Los resultados presentados en este trabajo de Tesis forman parte de las siguientes publicaciones:

- Ischemic Tolerance Protects the Rat Retina from Glaucomatous Damage.

Nicolás Belforte, Pablo H. Sande, Nuria de Zavalía, Diego C Fernandez, Dafne M. Silberman, Mónica S. Chianelli, Ruth E. Rosenstein

PLoS ONE 6 (8): e23763. doi:10.1371/journal.pone.0023763, 2011

- Early histological and functional study of radial optic neurotomy outcomes in normal rat eyes.

Nicolás A. Belforte, Pablo H. Sande, Damián Dorfman, J. Oscar Croxatto, Ruth E. Rosenstein

The Journal of Retinal and Vitreous Diseases 31(10):2115-2222, 2011.

- Chondroitin sulphate increases intraocular pressure in rats.

Nicolás Belforte, Pablo Sande, Nuria de Zavalía, Paul A. Knepper, Ruth E. Rosenstein

Investigative Ophthalmology and Visual Science 51(11): 5768-5775, 2010.

- Melatonin: a novel neuroprotectant for the treatment of glaucoma.

Nicolás A. Belforte, María C. Moreno, Nuria de Zavalía, Pablo H. Sande, Mónica Chianelli, María I. Keller Sarmiento, and Ruth E. Rosenstein

Journal of Pineal Research, 48(4), 353- 364, 2010.

- Effect of ocular hypertension on retinal nitridergic pathway activity.

Nicolás Belforte, María Cecilia Moreno, Cora Cymeryng, Melina Bordone, María Inés Keller Sarmiento, Ruth E. Rosenstein.

Investigative Ophthalmology and Visual Science 48:2127-33, 2007.

ABREVIATURAS 1
INTRODUCCIÓN 5
1. El ojo 5
1.1. Cámara anterior y humor acuoso 7
Producción y circulación del humor acuoso 9
La red trabecular 11
1.2. La retina 13
2. El glaucoma 17
Modelos experimentales de glaucoma 19
Mecanismos etiopatogénicos del glaucoma 22
3. El glutamato en la retina 23
Excitotoxicidad por glutamato 27
4. El GABA en la retina 29
5. El sistema de defensa antioxidante retiniano 34
6. El óxido nítrico en la retina 38
7. La melatonina en la retina 42
8. Condicionamiento Isquémico 46
9. Neurotomía óptica radial (NOR) 49
OBJETIVOS 52
MATERIALES Y MÉTODOS 53
1. Animales 53
1.1. Ratas 53
2. Administración intracameral de ácido hialurónico (AH) o condroitín sulfato (CS) 53
3. Determinación de la presión intraocular 54
4. Estudio del sistema nitrérgico 55
4.1. Determinación de la actividad de NOS 55
4.2. Determinación de los niveles de NOS-1 (nNOS), NOS-2 (iNOS) y NOS-3 (eNOS) 56
4.2.1 Preparación de las muestras 56
4.2.2. Western blot 56
4.3. Determinación de los niveles de ARNm para transportadores de L-arginina 57
4.4. Determinación del influjo de L-^{3}H-arginina 58

4.5. Determinación de la acumulación de GMPc 59
5. Evaluación de la actividad del ciclo glutamato/glutamina retiniano 60
5.1. Determinación del influjo de L -^{3}H-glutamato 60
5.2. Determinación de la actividad de glutamina sintetasa 60
5.3. Actividad de glutaminasa 61
6. Inyecciones intravítreas de melatonina 62
7. Determinación de la actividad del sistema GABAérgico retiniano 62
7.1. Determinación del turnover de GABA. 62
7.2. Determinación de la actividad de glutámico descarboxilasa (GAD) 63
8. Determinación de la actividad del sistema de defensa antioxidante endógeno 64
8.1. Actividad de superóxido dismutasa (SOD) 64
8.2. Determinación de los niveles de glutatión reducido (GSH) 64
8.3. Determinación de la peroxidación lipídica 65
8.4. Actividad de catalasa 65
8.5. Determinación del contenido de melatonina 66
9. Implantación subcutánea de un pellet de melatonina 67
10. Estudios electrorretinográficos (ERGs) 67
11. Potenciales visuales evocados (VEPs) 68
12. Inducción de tolerancia isquémica 69
13. Microscopía óptica y análisis de imágenes de la retina y nervio óptico de rata 70
13.1. Estudio histopatológico 70
13.2. Procesado de imágenes 70
14. Inmunomarcación de Neu-N, Thy-1 y Brn3a 71
15. Determinación de apoptosis 72
16. Morfometría del nervio óptico 72
17. Neurotomía óptica radial (NOR) 73
18. Evaluación histológica de la NOR 73
19. Evaluación del reflejo pupilar (RP) 74
20. Modelo experimental de glaucoma inducido por la cauterización de las venas epiesclerales 74
21. Determinación del contenido de proteínas 75
22. Análisis estadístico 75

RESULTADOS 76
1. Estudio del efecto de la hipertensión ocular sobre la actividad del sistema nitrérgico retiniano 76
2. Efecto de la melatonina como herramienta terapéutica para el tratamiento de las alteraciones funcionales e histológicas inducidas por hipertensión ocular crónica 82
2.1. Estudio del efecto in vitro de la melatonina sobre los sistemas involucrados en la fisiopatogenia del glaucoma 82
2.2. Estudio del efecto de la melatonina sobre las alteraciones funcionales e histológicos inducidas por la hipertensión ocular crónica 86
3. Desarrollo de un modelo experimental de glaucoma en ratas 90
4. La tolerancia isquémica protege la retina de la rata del daño glaucomatoso 99
5. Estudio de las consecuencias funcionales e histológicos tempranas de la neurotomía óptica radial (NOR) en ojos de rata normal 106
6. Neurotomía óptica radial: efecto preventivo y terapéutico en la neuropatía glaucomatosa 111
DISCUSIÓN 128
Consecuencias conceptuales de los resultados y perspectivas futuras 159
Epílogo 163
CONCLUSIONES 164
BIBLIOGRAFÍA 166

Abreviaturas

5-HT: serotonina

AA-NAT: Arilalquilamina N-acetiltransferasa

ACR: arteria central de la retina

AH: ácido hialurónico

AMPc: adenosina monofosfato cíclico

ANOVA: análisis de varianza

Brn3a: brain-specific homeobox/POU domain protein 3a

BSA: albúmina de suero bovino

CAT-1: transportador de aminoácidos catiónicos de tipo 1

CAT-2: transportador de aminoácidos catiónicos de tipo 2

CAT-3: transportador de aminoácidos catiónicos de tipo 3

CCG: capa de células ganglionares

CGR: células ganglionares retinianas

CNE: capa nuclear externa

CNI: capa nuclear interna

CPE: capa plexiforme externa

CPI: capa plexiforme interna

CS: condroitín sulfato

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

dpm: desintegraciones por minuto

EAAC-1: Transportador de aminoácidos excitatorios (excitatory amino acid carrier)

EAAT-1: Transportador de aminoácidos excitatorios (excitatory amino acid carrier) de tipo 1

EAAT-2: Transportador de aminoácidos excitatorios (excitatory amino acid carrier) de tipo 2

EAAT-3: Transportador de aminoácidos excitatorios (excitatory amino acid carrier) de tipo 3

EAAT-4: Transportador de aminoácidos excitatorios (excitatory amino acid carrier) de tipo 4

EAAT-5: Transportador de aminoácidos excitatorios (excitatory amino acid carrier) de tipo 5

EDTA: ácido etilendiamino tetra-acético

EE: error estándar

EGTA: ácido etilenglicol tetra-acético

EP: epitelio pigmentario

ERG: electrorretinograma

GABA: ácido gama-aminobutírico

GABA-T: GABA transaminasa

GAD: glutámico decarboxilasa

GAGs: glicosaminoglicanos

GAPDH: gliceraldehído 3- fosfato deshidrogenasa

GAT-1: transportador de GABA de tipo 1

GAT-2: transportador de GABA de tipo 2

GAT-3: transportador de GABA de tipo 3

GLAST: Transportador de glutamato y aspartato (Glutamate and aspartate transporter)

GLT1: Transportador de glutamato (Glutamate transporter) de tipo 1

GMPc: guanosina monofosfato cíclico

GPx: glutatión peroxidasa

GS: glutamina sintetasa

GSH: glutatión reducido

GSR: glutatión reductasa

h: hora

HEPES: Ácido N-2-Hidroxietilpiperacina-N'-2'-Etansulfónico

HIOMT: hidroxiindol-O-metiltransferasa

i.p.: intraperitoneal

i.v.: intravítrea

IBMX: isobutil-metilxantina

L-NAME: N-nitro-L-arginina metil éster

L-NMMA: N-mono-metil-L-arginina

LPS: lipopolisacárido bacteriano

min: minutos

MT1: receptores de melatonina de tipo 1

MT2: receptores de melatonina de tipo 2

NADPH: Nicotinamida-Adenina-Dinucleótido-Fosfato

NeuN: Neuronal Nuclei

NMDA: N-metil D-aspartato

NO: óxido nítrico

NOR: neurotomía óptica radial

NOS: óxido nítrico sintasa

O_2^-: anión superóxido

$OH^\bullet$: radical hidroxilo

$ONOO^-$: peroxinitrito

OCVR: oclusión de la vena central de la retina

PCI: precondicionamiento isquémico

PCIR: precondicionamiento isquémico remoto

PO: potenciales oscilatorios

PostC: postcondicionamiento isquémico

PostCR: postcondicionamiento isquémico remoto

PBS: buffer conteniendo 100 mM de fosfato diácido de sodio y 100 mM de NaCl pH 7,4

PFA: paraformaldehído

PIO: presión intraocular

PKC: proteína quinasa C

RIA: radioinmunoanálisis

RNS: especies reactivas del nitrógeno

ROS: especies reactivas del oxígeno

RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa en transcripción reversa

SDS: dodecil sulfato de sódio

SE: segmentos externos de los fotorreceptores

sem: semanas

SNC: sistema nervioso central

SOD: superóxido dismutasa

TBARS: especies reactivas del ácido tiobarbitúrico

TBPS: terbutil-ciclofosforotionato

TBS: buffer Tris conteniendo 0,15 M de NaCl y 50 mM de Tris-HCl

TCA: ácido tricloroacético

Thy-1: thymus cell antigen-1

TTBS: buffer Tris salinoconteniendo 0,05% de Tween

VCR: vena central de la retina

VEPs: Potenciales visuales evocados

1. El ojo

En mamíferos, el ojo es el único órgano especializado en el procesamiento de la información visual. La córnea y el cristalino concentran la luz y enfocan la imagen sobre la retina que descifra y codifica los diferentes elementos que componen la imagen (intensidad de luz, color, forma y movimiento). De esta forma, la retina constituye la primera estación de relevo del procesamiento de la información fótica. Esta información se transmite en forma de impulsos nerviosos por fibras nerviosas que se originan en la retina y que constituyen los nervios ópticos. Dependiendo de la especie, los nervios ópticos se entrecruzan parcial o totalmente en el quiasma óptico y se proyectan a través del tracto óptico a centros visuales del cerebro, que tras diversas etapas de procesamiento, darán origen a la imagen visual consciente. La información fótica proveniente de la retina proyecta también a otros centros del encéfalo involucrados en tareas reflejas como la adaptación del tamaño de la pupila a las condiciones de iluminación ambiental y la dirección de los ojos hacia blancos de interés. Asimismo, información de origen retiniano llega a centros no visuales especializados en la regulación del comportamiento asociado a los ritmos biológicos, particularmente a los núcleos supraquiasmáticos del hipotálamo.

La pared del globo ocular está constituida por tres capas, que de afuera hacia adentro son: 1) **la túnica externa-fibrosa o esclerocorneal**: formada por la esclera, el limbo esclerocorneal y la córnea; 2) **la túnica media-vascular, úvea o tracto uveal**: formada por la coroides, el tejido conectivo y músculos del cuerpo ciliar y el tejido conectivo y músculos del iris; y 3) **la túnica interna-nerviosa o retina**: formada por la porción de la retina fotosensible y el epitelio pigmentario, la porción de la retina no fotosensible, el epitelio del cuerpo ciliar y el epitelio del iris (Figura 1). El interior del ojo está ocupado por una materia transparente y de consistencia gelatinosa, denominada humor vítreo.

La túnica externa es una capa gruesa, fibrosa y resistente que protege las delicadas estructuras internas del ojo y junto con la presión del humor acuoso contribuye a mantener la forma y

turgencia del globo ocular. La mayor parte del globo ocular es opaca y se denomina esclera y es el sitio en el que se insertan los músculos que mueven el ojo. En la salida del nervio óptico, la esclera se reduce a una membrana fenestrada, la lámina cribosa. En su parte anterior, se diferencia en una estructura transparente denominada córnea. La córnea, al igual que la esclera, está esencialmente formada por colágeno, glicosaminoglicanos (GAGs) y agua, pero se diferencia de ella en su porcentaje de hidratación, que es menor que en la esclera, y en la disposición ordenada de fibras de colágeno (disposición hexagonal), que permiten disminuir la dispersión de la luz. De este modo, la córnea no sólo cumple una función de protección sino que además, permite la entrada de luz al ojo con escasa distorsión. La zona de transición entre la córnea y la esclera se denomina limbo esclerocorneal.

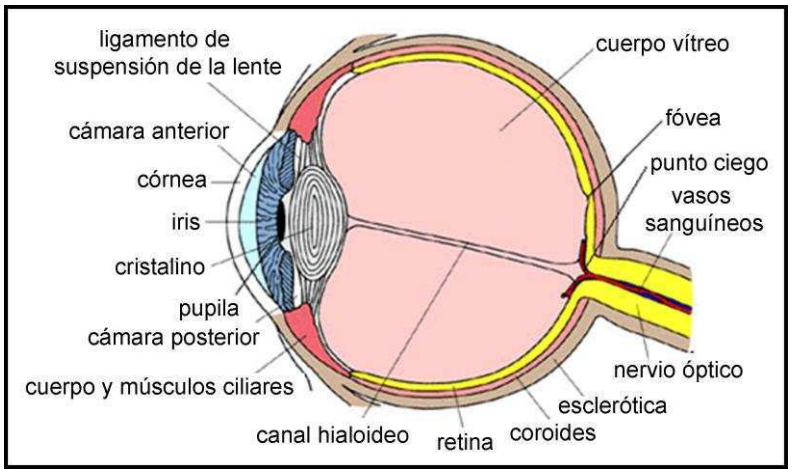

Figura 1. Representación esquemática de las principales estructuras oculares.

La úvea, una membrana vascular localizada entre la esclera y la retina, es una estructura frágil y pigmentada, formada principalmente por vasos y con alto contenido de melanina. Es la responsable de la nutrición y el mantenimiento de la retina y la esclera y de la producción de humor acuoso que nutre la córnea y el cristalino, ambos avasculares (revisado por Kanski, 2005). Posee tres regiones diferentes: 1) la coroides, porción más vascularizada de la úvea, situada por fuera de la retina; 2) el cuerpo ciliar, un engrosamiento que se extiende desde la periferia del iris hasta el comienzo de la retina, justo por detrás de la unión esclerocorneal, responsable de la

producción de humor acuoso y de la suspensión del cristalino; y 3) el iris, que se ubica por encima de la superficie anterior del cristalino y que contiene los músculos dilatador y constrictor y varía en su color de acuerdo al contenido de melanina. En el centro, el iris define un espacio circular llamado pupila, que regula la entrada de luz al ojo, a la manera del diafragma de una cámara fotográfica (Figura 1).

La retina es la capa más externa y es la porción del ojo sensible a la luz. Se extiende superficialmente sobre la coroides hasta la ora serrata, donde presenta un borde festoneado; luego se extiende como una delgada prolongación formando las porciones ciliar e irídea de la retina. La retina se encuentra firmemente unida en la papila óptica, donde se continúa con el nervio, y en la ora serrata, donde se une a la coroides. Las complejas redes nerviosas que codifican la información visual envían impulsos al cerebro a través del nervio óptico.

En el tercio anterior del ojo y suspendido por los músculos ciliares se encuentra el cristalino, una lente biconvexa y elástica. Su curvatura aumenta o disminuye por medio de las contracciones de estos músculos. El aumento o disminución de su curvatura es lo que permite acomodar la visión a diferentes distancias. La cara posterior del cristalino divide al ojo en un segmento anterior que lo incluye y que contiene el humor acuoso, y un segmento posterior, formado por una matriz extracelular transparente y gelatinosa, denominada humor vítreo o cuerpo vítreo. La córnea y el cristalino son los medios refractivos del ojo que permiten que la luz incida en la retina.

1.1. Cámara anterior y humor acuoso

Una correcta función visual requiere, al menos, de dos requisitos esenciales: que el globo ocular mantenga una forma constante, y que exista un trayecto transparente y sin alteraciones desde la superficie corneal hasta la retina. Como se mencionó anteriormente, no existe una perfusión vascular directa de la córnea y el cristalino, sino que la circulación normal del humor acuoso, a

través de las cámaras anterior y posterior, es responsable de la forma del globo ocular, de la claridad óptica y del metabolismo corneal y lenticular.

La cámara anterior es un área delimitada en forma anterior por la superficie posterior de la córnea, en su parte posterior por la superficie anterior del iris, y a nivel pupilar por la cara anterior del cristalino (Figura 2). En la periferia, la unión de la córnea con el iris determina un ángulo denominado seno-camerular, que contiene al trabeculado y se relaciona estrechamente con la raíz del iris y el cuerpo ciliar. Los tipos celulares que ocupan este espacio incluyen el endotelio trabecular y corneal, así como melanocitos y fibroblastos de la capa anterior del iris y del cuerpo ciliar. La cámara anterior contiene el humor acuoso, un líquido cristalino que en humanos tiene una densidad de 1,0034 a 1,0036 mg/ml, un índice de refracción de 1,3336 y un volumen de 0,25 ml. Su composición varía desde su formación en los procesos ciliares hasta su filtrado por el trabeculado. La composición del humor acuoso contiene una baja concentración de proteínas, altos niveles de ascorbato y difiere del plasma por la presencia de una barrera mecánica (Kolker y col., 1981; Sears, 1985), epitelial/endotelial (barrera sangre-humor acuoso) y por el transporte activo de varias sustancias orgánicas e inorgánicas desde el epitelio ciliar (revisado por Sampaolesi, 1991).

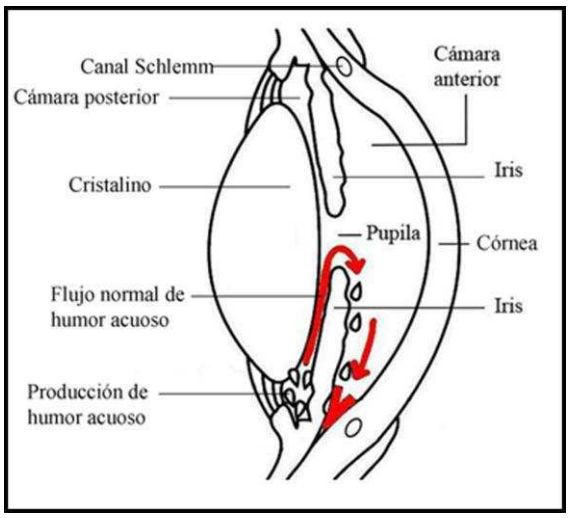

Figura 2. Representación esquemática del segmento anterior del ojo y de la circulación del humor acuoso

Producción y circulación del humor acuoso

El humor acuoso se produce en el cuerpo ciliar. El ajustado balance entre la producción y la eliminación de este fluido es responsable de mantener la forma del ojo y la presión intraocular (PIO). La formación de humor acuoso depende de la combinación entre una fuerza hidrostática y un gradiente de presión osmótica generado por el epitelio ciliar. Este último provoca la difusión de agua a través de un gradiente de concentración, debido a un transporte activo de electrolitos y moléculas pequeñas a través de dos capas de epitelio (pigmentada y no pigmentada).

El transporte activo se produce en las células no pigmentadas y el gradiente generado se mantiene debido a los complejos de unión que existen entre las células (zónula occludens) que restringen el pasaje de sustancias y forman una barrera sangre-humor acuoso (Vegge y Ringvold, 1971; Smith y Rudt, 1973; Raviola, 1974; 1977). La formación de humor acuoso ocurre por tres mecanismos: 1) difusión, 2) ultrafiltración y 3) secreción activa. De estos tres mecanismos, la secreción activa es en mayor medida responsable de la composición química y el volumen del humor acuoso (Macknight y col., 2000). La velocidad de producción de humor acuoso en ratas es aproximadamente 0,350 μl/min y su tasa de recambio es de 2,23% por minuto (Mermoud y col., 1996), y en humanos, es aproximadamente 2,5 μl/min, y alrededor del 1% de este fluido es reemplazado por minuto (Stamper, 1992).

Diversos mecanismos colinérgicos y adrenérgicos desempeñan un papel relevante en la formación y drenaje de humor acuoso, tanto en la fisiología normal como en la terapia del glaucoma. El estímulo parasimpático, además de contraer la pupila (miosis), contrae el músculo ciliar, que tracciona el trabeculado y aumenta la salida de humor acuoso, disminuyendo la PIO. A nivel simpático, el efecto es paradojal. El uso de algunos agonistas adrenérgicos aumenta la salida de humor acuoso actuando sobre el trabeculado; sin embargo el uso de β-bloqueantes tópicos también disminuye la PIO, reduciendo la formación de humor acuoso a nivel del cuerpo

ciliar. Alteraciones moderadas de la presión sanguínea sistémica y del flujo sanguíneo del proceso ciliar no afectan significativamente la formación del humor acuoso.

La circulación del humor acuoso está determinada por el gradiente de presión entre la cámara posterior y la anterior y por las diferencias de temperatura entre el iris (mayor temperatura) y la córnea. El humor acuoso entra a la cámara posterior desde el proceso ciliar a través de un gradiente hidrostático y osmótico. Luego, fluye alrededor del cristalino, y a través de la pupila se dirige hacia la cámara anterior. Finalmente, abandona el ojo por flujo pasivo en el ángulo de la cámara anterior por dos vías: 1) la vía trabecular, a través de la cual primero ingresa al trabeculado, pasa al lumen del canal de Schlemm y luego a las venas epiesclerales, desde donde llega a la circulación venosa general y 2) la vía uveoescleral, a través de la cual desde la raíz del iris alcanza la malla escleral, luego pasa por la cara anterior del músculo ciliar y abandona el ojo a través de los vasos esclerales (Figura 2). En humanos, la vía trabecular drena el 80% del total del flujo de humor acuoso y el 20% restante lo hace por la vía uveoescleral. En varias especies de monos se ha demostrado que la vía trabecular drena entre un 45 a un 70% del total del humor acuoso (Bill, 1977). En ojos de personas de edades avanzadas y pacientes con tumores en el segmento posterior, se ha descripto un drenaje de entre el 5 al 20% del total del fluido por vía uveoescleral (Bill y Phillips, 1971). Otros estudios demuestran que en ratones esta vía drena un porcentaje similar al de humanos (Aihara y col., 2003).

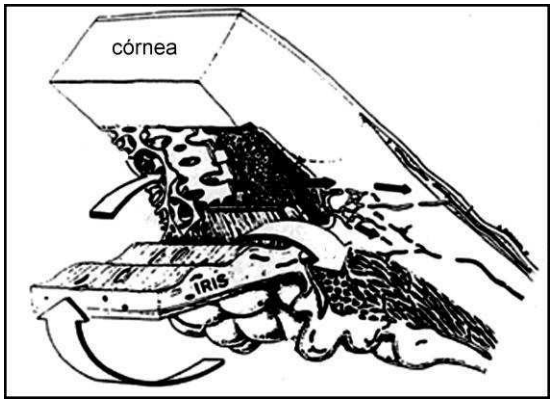

Figura 2. Representación esquemática de las vías de salida del humor acuoso

La red trabecular

Justo por encima del espolón escleral se encuentra el trabeculado. La porción anterior-uveal está formada por fibras que se continúan con la inserción del iris. La porción posterior esclerocorneal consiste en un empaquetado de fibras densas que se extienden desde la córnea hasta el espolón escleral. Esta estructura está constituida por una red entrelazada de finos haces de tejido conectivo con espacios intermedios de hasta 70 micrones. Las trabéculas están formadas por un corazón de colágeno y fibras elásticas, rodeadas por más fibras elásticas y una zona cortical que consiste en colágeno parcialmente polimerizado y la membrana basal de las células endoteliales trabeculares más externas (Figura 3).

El canal de Schlemm se localiza en la parte inferior del trabeculado. Las células endoteliales en esta capa están íntimamente asociadas entre sí y a la membrana basal mediante complejos de unión. Estas células secretan el material de la membrana basal, precursores de colágeno (prolina e hidroxiprolina), fibras elásticas y GAGs. Los GAGs están constituidos por largas cadenas de azúcares no ramificadas, formadas por la repetición sucesiva de unidades de disacáridos (Davies y col., 2001; Sasisekharan y col., 2006). Los principales tipos de GAGs son: el condroitín sulfato (CS), el dermatán sulfato (DS), el heparán sulfato (HS), el keratán sulfato (KS) y el ácido hialurónico (AH). Todos los GAGs, con excepción del AH, poseen grupos sulfato en varias posiciones y proporciones. Por ejemplo, las cadenas de CS son por lo general sulfatadas en el grupo hidroxilo 4 y/ó 6, las cadenas de DS en la posición hidroxi 4 y 2, mientras que las cadenas de HS pueden estar sulfatadas en el grupo hidroxi 2, 6 y/ó 3 (Silbert y Sugumaran, 2002; Sugahara y Kitagawa, 2002). A su vez, todos los GAGs con excepción del AH, se unen covalentemente a un núcleo proteico formando un proteoglicano a medida que pasan por el retículo endosplásmico y el aparato de Golgi. Las células endoteliales del trabeculado tienen actividad fagocítica y la capacidad de migrar a través de los haces trabeculares (Rohen y Van der Zypen, 1968). Por lo tanto, la función del endotelio no es sólo mantener la integridad estructural

de las trabéculas, sino también contribuye a mantener la función de filtración del área, especialmente cuando concentraciones anormales de alguna sustancia impiden la salida del humor acuoso.

Como ya se mencionó, la principal vía de salida del humor acuoso es el trabeculado que está ubicado en el ángulo iridocorneal. La apariencia clínica de esta estructura permite inferir la facilidad de salida del humor acuoso. Los ángulos cerrados o estrechos y aquellos con depósitos patológicos tendrán una disminución en el drenaje, con el consiguiente aumento de la PIO.

Evidencias anátomo-fisiológicas indican que el sitio primario de resistencia al flujo acuoso reside en la red trabecular, la porción profunda de la red esclerocorneal y la membrana basal yuxtacanalicular cercana al canal de Schlemm (Tamm y col., 2004). Una intensa tinción histoquímica en varias capas del trabeculado humano indica la presencia de cantidades sustanciales de AH y CS en las vías de salida del humor acuoso y un análisis cuantitativo demuestra que el AH y el CS son los GAGs más abundante en el trabeculado humano (Acott y col., 1985; Lerner y col., 1997). Se ha descripto 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., 1990).

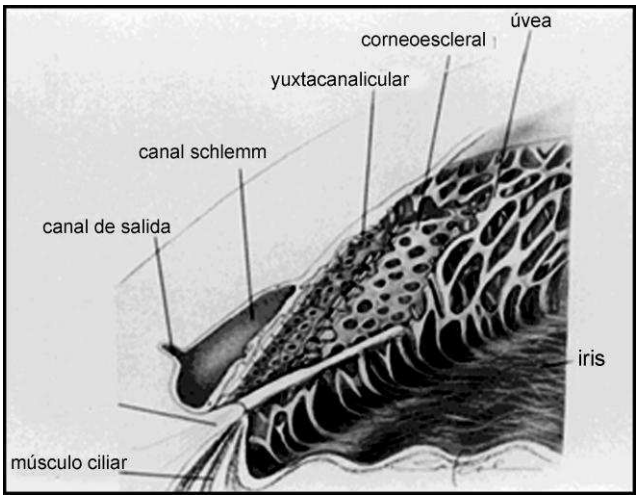

Figura 3. Representación esquemática de las capas del trabeculado

1.2. La retina

La retina es una lámina fina de tejido nervioso situada en el fondo del ojo, que constituye una prolongación del sistema nervioso central. 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 de mamíferos está constituida por seis tipos celulares principales (Dowling, 1979) que se conectan a través de sinapsis: los fotorreceptores (conos y bastones), las células bipolares (ON u OFF), ganglionares, horizontales, amácrinas y las células de Müller, el principal tipo de célula glial de la retina (Figura 4). Las principales capas de la retina desde la más externa a la más interna del ojo son: 1) el epitelio pigmentario (EP), 2) la capa de segmentos externos (SE) de los fotorreceptores, 3) la capa nuclear externa (CNE), que contiene los cuerpos celulares de los conos y los bastones, 4) la capa plexiforme externa (CPE), donde hacen sinapsis los axones de los fotorreceptores con las dendritas de las células horizontales y bipolares, 5) la capa nuclear interna (CNI), que contiene los núcleos de las células horizontales, amácrinas y bipolares, 6) la capa plexiforme interna (CPI), donde hacen sinapsis las células bipolares y amácrinas con las células ganglionares, y finalmente, 7) la capa de células ganglionares (CCG), que contiene células ganglionares y amácrinas desplazadas (Figura 4). El EP está compuesto por una capa de células diferenciadas que contienen un pigmento negro llamado melanina. La melanina absorbe la luz que no es capturada por la retina, evitando que ésta se refleje en la parte posterior del ojo (Hubel, 1988) y vuelva a la retina, lo que degradaría la imagen visual.

Los fotorreceptores de los vertebrados son células únicas en forma y función. Existen dos tipos de células fotorreceptoras: los conos y los bastones. Sus segmentos externos son la porción sensible a la luz, y su morfología da nombre a cada uno de ellos. Contienen el pigmento visual

así como los demás componentes de la cascada de fototransducción, en la que participan diversos mensajeros, enzimas y canales iónicos.

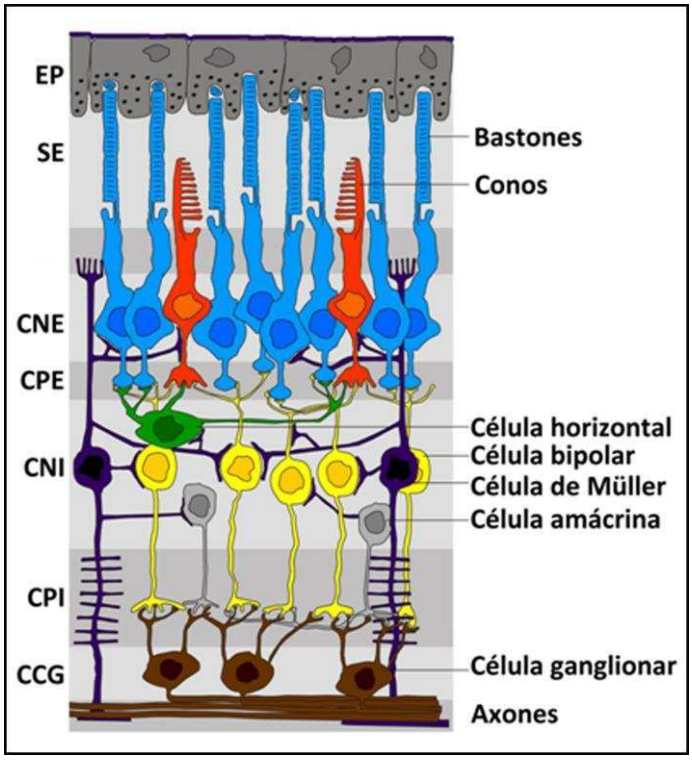

Figura 4. Representación esquemática de la retina con la disposición de los distintos tipos celulares. EP: el epitelio pigmentario, SE: capa de segmentos externos de los fotorreceptores, CNE: capa nuclear externa, CPE: capa plexiforme externa, CNI: capa nuclear interna, CPI: capa plexiforme interna, CCG: capa de células ganglionares.

El segmento externo de los bastones está formado por discos membranosos apilados en forma ordenada. Estos discos son estructuras saculares donde las paredes de doble membrana quedan separadas por el espacio intradiscal. En estos discos se localiza el pigmento visual: rodopsina en los bastones y conopsinas en los conos. En los conos, el segmento externo está constituido por numerosos pliegues de membrana apilados que se abren al medio extracelular. En ambos tipos de fotorreceptores, los segmentos externos se encuentran unidos a los segmentos internos a través de un tallo estrecho o cilio. El cuerpo celular de los fotorreceptores contiene al núcleo. En la

mayoría de las especies de mamíferos, los bastones son aproximadamente 20 veces más numerosos que los conos (Masland, 2001a), aunque la cantidad de ambos tipos celulares varía marcadamente sobre la superficie de la retina. En el centro de la retina humana y de primates (área denominada fóvea), donde la agudeza visual es máxima, se observan sólo conos (Figura 5).

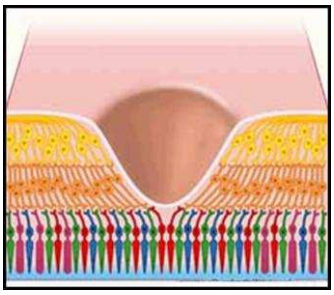

Figura 5. Representación esquemática de la fóvea

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. Por consiguiente, ésta debe atravesar las otras capas antes de alcanzar la capa de fotorreceptores, salvo en la fóvea, donde la luz incide directamente. Por lo tanto, la posición de la retina se encuentra "invertida" respecto a la entrada de la luz (Figura 6). Las células bipolares reciben input directo de los fotorreceptores y hacen sinapsis con las células ganglionares retinianas (CGR); son más numerosas que las células horizontales y amácrinas, y dominan la capa media de la retina. Existen distintos tipos de células bipolares que pueden estar conectadas exclusivamente a bastones o a conos. Las células horizontales conectan los fotorreceptores con las bipolares, y las células amácrinas establecen conexiones sinápticas, paralelas a la superficie retiniana, entre neuronas bipolares y ganglionares. Por último, las CGR se ubican en la capa retiniana más cercana al centro del globo ocular, sus axones forman el nervio óptico y proyectan fuera del ojo, a través del disco óptico o papila. En base a las conexiones anatómicas y funcionales entre los distintos tipos celulares retinianos, se considera 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 ganglionares y

uno indirecto, en el que las células horizontales se interponen entre los fotorreceptores y las células bipolares, y las amácrinas entre las bipolares y las 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 la vía directa, 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. Esta relación entre fotorreceptores, células bipolares y ganglionares, es cada vez más convergente hacia la periferia. La ventaja de este sistema es la alta densidad de muestreo que permite una gran resolución espacial (Masland, 2001b; revisado por Kandel, 2001).

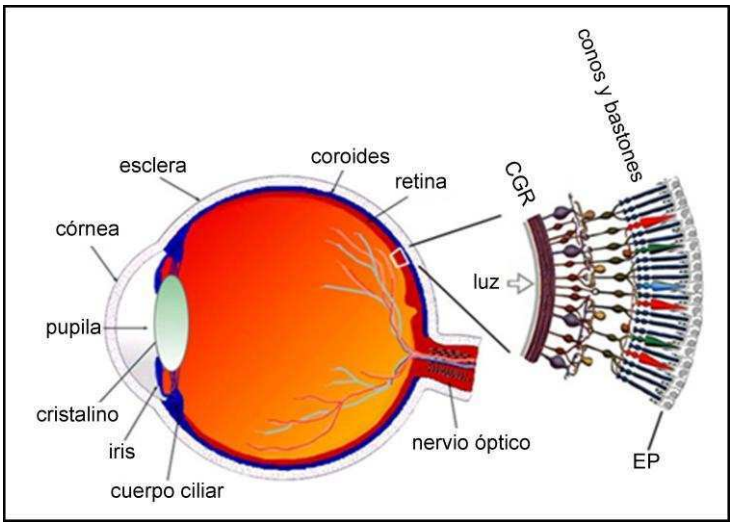

Figura 6. Esquema del ojo de vertebrados con una porción de retina ampliada donde se aprecia su disposición y organización. CGR: células ganglionares de la retina, EP: epitelio pigmentario.

El principal neurotransmisor excitatorio de la retina, el glutamato, es el transmisor responsable de la vía directa de la información visual. El glutamato es liberado desde los fotorreceptores a células bipolares y horizontales y desde las células bipolares a las ganglionares y amácrinas. En oscuridad, el glutamato es liberado en forma tónica por los fotorreceptores a la brecha sináptica y su liberación se interrumpe con la exposición del fotorreceptor a luz. El glutamato induce despolarización de las células bipolares OFF e hiperpolarización de las bipolares ON. Estas

células a su vez, liberan glutamato en las sinapsis con las CGR. Un conjunto variado de señales liberadas por células horizontales y amácrinas, que incluyen al ácido γ-aminobutírico (GABA), la glicina y la dopamina, modulan esta vía directa.

2. El glaucoma

El glaucoma se conoce desde la antigüedad; su nombre deriva del griego Glaukos que significa verde pálido, el color con el que los griegos describían los ojos de los ancianos ciegos, y el color que, efectivamente, toman las pupilas de los enfermos con glaucoma avanzado.

El glaucoma define a un grupo de desórdenes visuales que constituye una de las principales causas de ceguera irreversible en los países desarrollados. Es una disfunción ocular de alta prevalencia, caracterizada por manifestaciones clínicas e histopatológicas que incluyen una pérdida progresiva de las funciones visuales, que se acompaña de la muerte de CGR y la atrofia progresiva de la cabeza del nervio óptico. Una complejidad adicional del glaucoma es que su curso es prácticamente asintomático hasta etapas avanzadas de pérdida visual, debido a que la enfermedad afecta en primera instancia el campo visual periférico y sólo en las últimas etapas compromete la visión central. La pérdida de la función visual es irreversible.

El común denominador de todas las formas de glaucoma es la neuropatía óptica característica, que se asocia con varios factores de riesgo, entre los cuales el más importante es la hipertensión ocular (Van Buskirk y Cioffi, 1992). De hecho, la farmacología disponible para el tratamiento de esta disfunción está orientada esencialmente hacia el control de la PIO. Sin embargo, ya en 1857, Albrecht Von Graefe describió el glaucoma de presión normal en pacientes que desarrollaban esta misma neuropatía con una PIO por debajo del límite establecido (Lozano-Elizondo, 2010). Actualmente se estima que este tipo de glaucoma tiene una incidencia en la población del 0,6% (Bonomi y col., 1998). Por otro lado, también se han observado pacientes con hipertensión ocular que no desarrollan la neuropatía. Existen distintas formas de clasificar los glaucomas.

Según su etiología, se dividen en primarios (sin causa aparente) o secundarios a otras patologías como diabetes, miopía y uveítis entre otras (Daubs y Crick, 1981; Richler y col., 1982; Klein y col., 1994). De acuerdo a la apariencia del ángulo de la cámara anterior, pueden ser glaucomas de ángulo abierto o cerrado. Por último, según su evolución pueden cursar en forma aguda o crónica. El glaucoma crónico de ángulo abierto es la forma más frecuente (60-70%) (Choong y col., 2003). Se ha postulado la influencia de un factor hereditario (Shin y col., 1977), así como de un componente etario (Quigley y col., 1994;) y racial (Tielsch y col; 1994). En un ojo glaucomatoso, la resistencia a la salida del humor acuoso está incrementada, causando una elevación de la PIO. En el glaucoma primario de ángulo abierto, el mecanismo preciso de este aumento de la resistencia es aún elusivo, aunque muy probablemente esté asociado a alteraciones a nivel del trabeculado y/o el canal de Schlemm (Cernea, 1993).

El diagnóstico clínico del glaucoma se fundamenta en tres alteraciones oculares: el aumento de la PIO, la alteración concéntrica del campo visual y la excavación de la papila debida a la pérdida de axones del nervio óptico. Si bien, como ya se mencionara, la disminución farmacológica de la PIO es por ahora la terapia de elección, en muchos casos se ha observado que la pérdida visual persiste luego de su restauración a valores normales a través de terapias farmacológicas o quirúrgicas. A pesar de la gran variedad de fármacos disponibles (agonistas o antagonistas adrenérgicos, agonistas colinérgicos o inhibidores de la colinesterasa, entre otros) aún existe controversia en la terapia médica del glaucoma. En el inicio de la enfermedad, el tratamiento frecuente es la administración tópica de alguno de estos fármacos. Cuando el daño en el nervio o en el campo visual progresa a pesar de la terapia farmacológica (Edmunds y col., 1999) o no se logra un adecuado control de la hipertensión, se recurre a una intervención quirúrgica que puede optar entre dos modalidades: una esclerotomía penetrante o no penetrante. La primera consiste en la creación de una vía accesoria de filtración del humor acuoso mediante la eliminación de la malla trabecular y de una comunicación permanente entre la cámara anterior

y posterior. La segunda técnica consiste también, en la creación de una vía accesoria de filtración del humor acuoso a través de la esclera por eliminación de la malla trabecular pero sin penetrar en la cámara anterior.

Modelos experimentales de glaucoma

Desde hace varias décadas, la comunidad científica internacional reconoce el uso de modelos animales como una herramienta útil para el estudio de la patología humana. La similitud de un proceso patológico en animales de experimentación, aún con diferencias respecto al humano, contribuye significativamente a la comprensión de un proceso en su contraparte humana. A pesar de múltiples intentos, el desarrollo de modelos para el estudio del glaucoma todavía no ha alcanzado consenso en un modelo que reproduzca completamente la enfermedad en animales de laboratorio y sea reproducible. Los modelos experimentales de glaucoma previamente descriptos son generalmente inducidos por impedimento de la salida de humor acuoso. En este sentido, las estrategias más frecuentemente utilizadas son: 1) la inyección de solución salina hipertónica en las venas acuosas (Morrison y col., 1997), 2) la cauterización u oclusión de 2 ó 3 de las venas epiesclerales (Shareef y col., 1995), 3) el bloqueo del flujo acuoso por fotocoagulación luego de la inyección de tinta china en la cámara anterior del ojo (Ueda y col., 1998), 4) la inyección de microesferas de látex en la cámara anterior del ojo que bloquea el drenaje del humor acuoso a nivel de la red trabecular (Weber y Zelenak, 2001) y 5) el uso de cepas de animales en los que la patología se produce por alteraciones genéticas (Anderson y col., 2002). En este último caso, los ratones DBA/2J desarrollan una hipertensión ocular espontánea que se hace evidente entre los 8 - 10 meses de vida. Este aumento de la PIO se debe a la mutación recesiva de dos genes, Gpnmb y Tyrp-1 y tiene como consecuencia una atrofia del estroma del iris y una dispersión del pigmento que produce la obstrucción de la vía de salida del humor acuoso provocando el aumento de la PIO que se asimila al glaucoma pigmentario en humanos. Ninguno de estos modelos es ideal, en

muchos casos requieren de equipos especializados y del aprendizaje de técnicas de difícil manejo; los animales desarrollan glaucoma en forma relativamente tardía y requiere un compromiso de tiempo significativo para la experimentación, o presentan una cinética de elevación de la PIO significativamente diferente a la de los humanos.

Si bien se ha sugerido una relación causal entre la alteración del metabolismo de GAGs trabeculares y el glaucoma, no se disponía de un modelo animal que permitiera evaluar esta hipótesis en forma directa. Como ya se mencionó, los tipos predominantes de GAGs en el trabeculado son el AH y el CS. Trabajos pioneros de Barany y Scotchbrook (1954) demostraron que el tratamiento de ojos de gato con hialuronidasa testicular bovina disminuye la resistencia al filtrado de humor acuoso en el ángulo, a casi la mitad de su valor inicial. Desde entonces, se ha dedicado considerable atención a los mucopolisacáridos sensibles a hialuronidasa en el sistema de salida del flujo acuoso. En este sentido, se ha demostrado que la hialuronidasa testicular incrementa el flujo de humor acuoso en ojos de perros (Van Buskirk y Brett, 1978) aunque la evidencia sugiere un efecto menor en ojos humanos (Hayasaka y Sears, 1978). Asimismo, se demostró una correlación entre la remoción del AH y la disminución en el flujo de humor acuoso en ojos de conejo (Kneper y col., 1984), perro (Van Buskirk y Brett, 1978) y vaca (Barany y Scotchbrook, 1954), pero no en ojos de primates (Hubbard y col., 1997). Por lo tanto, estas evidencias sugieren que en algunas especies, existe una barrera de GAGs que disminuye la salida del humor acuoso y que es sensible a la hialuronidasa testicular. En primates, la evidencia de la presencia de una barrera de GAGs es poco concluyente (Hubbard y col., 1997, Sawaguchi y col., 1992). En trabajos previos de nuestro laboratorio, se ha demostrado que la brimonidina, un hipotensor ocular de uso frecuente, aumenta significativamente la actividad de hialuronidasa en el trabeculado del conejo, y hemos postulado que el efecto hipotensor de este fármaco podría deberse, al menos en parte, a la capacidad de aumentar el clearance de AH trabecular (Benozzi y col., 2000). Si una disminución en el contenido de GAGs trabeculares disminuye la PIO,

parece posible que el aumento en el contenido de AH o CS trabecular induzca el efecto opuesto. Varios estudios de microscopía óptica y electrónica, así como estudios inmunohistoquímicos describieron una excesiva acumulación de materiales de la matriz extracelular en el trabeculado de pacientes con glaucoma primario de ángulo abierto (Fine y col., 1981; Rohen, 1983; Johnson, 2006). Resultados similares se obtuvieron en un modelo de glaucoma cortisónico experimental en conejos (François y col., 1984).

Se dispone de considerable cantidad de evidencias a partir del uso de agentes viscoelásticos en la práctica oftalmológica que avalan el vínculo entre los GAGs y la PIO. Estos agentes contienen AH y CS y se han convertido en una herramienta esencial en la cirugía del segmento anterior para generar espacio y reducir el trauma y la pérdida de células endoteliales. Estos agentes son responsables de causar o exacerbar en forma transitoria, pero a veces significativa, una elevación post-quirúrgica de la PIO (Jurgens y col., 1997). Se ha demostrado que la inyección de sustancias viscoelásticas conteniendo AH aumenta la PIO en conejos (Harooni y col., 2000). Estos resultados sugieren que el AH y el CS podrían participar en la regulación del flujo de humor acuoso y que la acumulación de estos GAGs en el trabeculado podría cumplir un rol significativo en el glaucoma de ángulo abierto. Basado en este conjunto de evidencias, en trabajos previos de nuestro laboratorio se ha desarrollado un modelo experimental de glaucoma a través de la administración semanal de AH en la cámara anterior del ojo. En este sentido, hemos demostrado que la inyección aguda o crónica de AH (al 1%) aumenta significativamente la PIO en el ojo de rata (Benozzi et al, 2002). Asimismo, hemos demostrado que la hipertensión ocular inducida por AH es disminuida por la aplicación tópica de diversos hipotensores de uso clínico y que las inyecciones semanales de AH no modifican el ritmo diario de la PIO. Luego de 6 semanas de hipertensión ocular inducida por AH, se observó una disminución significativa en la amplitud de las ondas a y b del electrorretinograma escotópico. Esta disfunción es aún mayor luego de 10 semanas de tratamiento con AH. A las 10 semanas de hipertensión ocular se observa

una disminución significativa en el número de células de la CCG y de fibras del nervio óptico (Moreno y col., 2005a). En suma, estos resultados indican que la administración crónica de AH reproduce características centrales del glaucoma humano. Este modelo experimental de glaucoma ha sido utilizado en la primera parte de esta Tesis doctoral como herramienta para evaluar la participación del sistema nitrérgico en el daño glaucomatoso, así como el efecto terapéutico de la melatonina. Sin embargo, su utilización debió ser abandonada porque la empresa fabricante de este reactivo (Sigma) interrumpió en forma definitiva su producción. Hemos realizado múltiples intentos para reemplazar este producto con reactivos similares de ésta u otras empresas, pero no hemos logrado reproducir los resultados originales obtenidos con el tipo particular de AH con el que se realizaron estos experimentos. Por lo tanto, uno de los objetivos de este trabajo de Tesis fue el desarrollo de un modelo experimental de glaucoma alternativo, a través de la administración intracameral de otro GAG, el CS.

Mecanismos etiopatogénicos del glaucoma

Como ya se mencionara, múltiples pruebas experimentales demuestran que el aumento de la PIO desempeña un rol causal, aunque no exclusivo, en la pérdida visual glaucomatosa. Se ha sugerido que factores adicionales como la isquemia (Cioffi, 2001), la excitotoxicidad inducida por glutamato (Vorwerk y col., 1999; Osborne y col., 1999), la deprivación de factores de crecimiento (Quigley, 1999) o el daño oxidativo (Ohia y col., 2005) pueden contribuir significativamente al progreso de la enfermedad. Se describirán a continuación las evidencias que vinculan algunos de estos factores con la fisiopatología retiniana, haciendo particular hincapié en el posible vínculo con la neuropatía glaucomatosa.

3. El glutamato en la retina

El glutamato es el principal neurotransmisor del sistema nervioso central en general y de la retina en particular. Sin embargo, diversas evidencias experimentales demuestran que en concentraciones suprafisiológicas, el glutamato puede ser una potente neurotoxina. Por ello, la regulación apropiada de la homeostasis de glutamato es una condición necesaria para mantener una comunicación neuronal normal y evitar la excitotoxicidad.

Como ya se mencionara, en la retina el glutamato es liberado por los fotorreceptores y las células bipolares. Las fuentes principales de glutamato en las neuronas que utilizan este aminoácido como neurotransmisor son: i) su síntesis a partir de α-cetoglutarato o aspartato; ii) su recaptación desde el espacio extracelular y iii) su síntesis a partir de glutamina proveniente de células de la glía. Luego de su liberación, el glutamato interactúa con receptores postsinápticos específicos. La finalización adecuada de la señal requiere de su captación por células de la glía, donde el glutamato es amidado en una reacción catalizada por la glutamina sintetasa (GS) y convertido en un producto no tóxico: la glutamina. Ésta es posteriormente liberada por las células de Müller y recaptada por neuronas, donde se hidroliza en una reacción catalizada por la glutaminasa para formar nuevamente glutamato, completando el ciclo glutamato/glutamina (Poitry y col., 2000). De esta forma, el pool de glutamato se preserva y se previene la neurotoxicidad. Una característica central de este ciclo es que la perturbación de cualquiera de los procesos que lo componen podría afectar en forma significativa el clearance y reciclado del neurotransmisor (Pow, 2001). Conjuntamente con diversas evidencias que avalan la participación del ciclo glutamato/glutamina (Figura 7) en el control de las concentraciones sinápticas de glutamato en la retina (Bak y col., 2006), un hallazgo adicional de relevancia a favor de ello, fue la descripción de reservorios intracelulares de glutamina y glutamato en células de Müller y neuronas, respectivamente (Ishikawa, 1996)

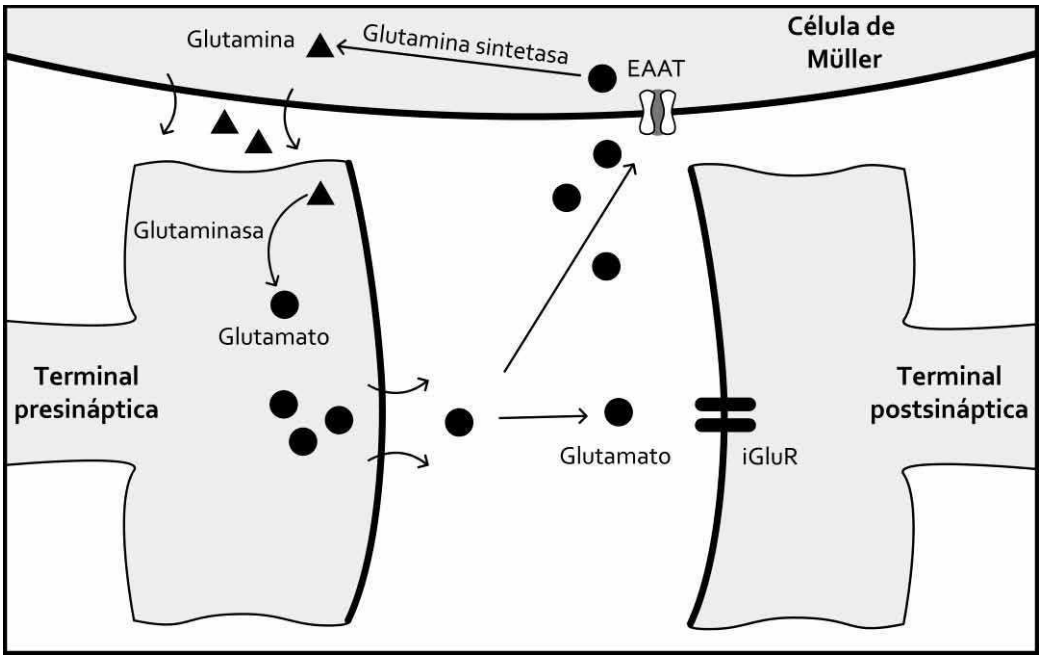

Figura 7. Representación esquemática del ciclo glutamato/glutamina. Una vez liberado al espacio sináptico, el glutamato es removido de la sinapsis a través de transportadores específicos que permiten su acceso al interior de las células de Müller, en las que es convertido en glutamina por la actividad de glutamina sintetasa. La glutamina se libera de estas células y se incorpora a neuronas retinianas en las que se reconvierte en glutamato en una reacción catalizada por la glutaminasa. iGluR: receptor post-sináptico ionotrópico de glutamato y EAAT: transportador de glutamato

Los transportadores de glutamato son responsables de controlar la concentración del neurotransmisor, y por ello, desempeñan un rol central en la regulación del balance entre la señalización fisiológica y la sobreactivación patológica (Rauen y Wiessner, 2000). La recaptación retiniana de glutamato es un proceso de alta afinidad, electrogénico y acoplado al gradiente de Na^+ transmembrana. Una molécula de glutamato se cotransporta con 3 de Na^+ y un H^+ y contra-transporta con un K^+. Por lo tanto, como consecuencia del influjo de glutamato, se produce una translocación neta de dos cargas positivas y acidificación intracelular (Amara y Fontana, 2002). Hasta el momento se han descripto cinco tipos de transportadores de glutamato: GLAST (L-glutamate-arginine transporter) o EAAT-1 (excitatory aminoacid transporter), GLT-1 (glutamate transporter) o EAAT-2, EAAC-1 o EAAT-3, EAAT-4 y EAAT-5 (Rauen, 200; Rauen y col., 1998; Kanai y Endou, 2001; Bak y col. 2006). Se ha demostrado la presencia

de transportadores de tipo GLAST, GLT-1 y EAAC-1 en la retina de rata. Tanto por métodos inmunohistoquímicos como autorradiográficos, se ha demostrado que la recaptación de glutamato tiene lugar en células de Müller, en astrocitos y en células del epitelio pigmentario, pero no en la microglía y en muy bajo porcentaje en neuronas retinianas (Ehinger y Falck, 1971; Derouiche y Rauen, 1995). El transportador de tipo GLAST es el principal transportador de glutamato en la retina, se expresa en procesos de las células de Müller y en células GABAérgicas (Derouiche y Rauen, 1995; revisado por Tanaka, 2000); el transportador de tipo GLT-1 se localiza en células bipolares conectadas con conos y el EAAC-1 en células horizontales, amácrinas y ganglionares (Pow, 2001). El nivel relativo de expresión de transportadores de glutamato en la retina de mamíferos es el siguiente: GLAST ≥ EAAC-1 > GLT-1 (Rauen y Wiessner, 2000).

Diversos factores pueden regular la actividad de los transportadores de glutamato. Por ejemplo, cambios en el estado de fosforilación de los transportadores de tipo EAATs afectan significativamente su función, tanto a corto, como a largo plazo (Pow, 2001). Por otra parte, los transportadores de glutamato son capaces de transportar el sustrato en ambas direcciones en función del potencial químico (Szatkowski y col., 1990) y de los gradientes iónicos a ambos lados de la membrana, por lo que modificaciones en la concentración intracelular de ATP influyen en el sentido del transporte (Anderson y Swanson, 2000).

La GS es la enzima que cataliza la conversión de glutamato y amonio en glutamina, a través de un proceso dependiente de ATP. Se ha demostrado que los transportadores de glutamato y la GS coexisten en una misma célula de Müller, lo que ha llevado a postular que la actividad de las proteínas que median la recaptación de glutamato y su conversión a glutamina podrían ser concertadas (Derouiche y Rauen, 1995; Shaked y col., 2002). La actividad de la GS en células de Müller les confiere una gran capacidad de remover glutamato extracelular, dado que la conversión de glutamato en glutamina es muy rápida, lo que provee una fuerza motriz para el

influjo de glutamato mayor que en neuronas que tienen una concentración intracelular mayor de glutamato libre. De esta forma, la actividad acoplada de GLAST y GS (ambos componentes centrales del ciclo glutamato/glutamina retiniano) en las células de Müller es central para el control del clearance del neurotransmisor (Rauen y Wiessner, 2000). De hecho, se ha demostrado que el reciclado de glutamato extracelular en la retina de pollo es regulado por la expresión de GS en las células de Müller (Shaked y col., 2002), así como una acción neuroprotectora de la GS in vitro, en particular luego de isquemia (Gorovits y col., 1997). La transferencia de glutamina entre astrocitos y neuronas involucra su eflujo a través de la membrana de las células gliales y su influjo por la membrana plasmática neuronal, ambos procesos mediados por transportadores específicos. Los transportadores de glutamina se clasifican principalmente en 2 categorías en función de su dependencia de Na^+: i) los transportadores dependientes de Na^+ utilizan la energía potencial asociada al gradiente electroquímico transmembrana del ión, mantenido por la bomba Na^+/K^+ ATPasa e incluyen a los sistemas A, ASC (o B^0), B^{0+}, N e y^{+L} , ii) los transportadores independientes de este catión son los sistemas B^{0+}, L y N (Bode, 2001; Bröer y Brookes, 2001; Kanai y Endou, 2001). Una vez dentro de la neurona, la glutamina se transforma en glutamato en una reacción catalizada por la glutaminasa, enzima que se ubica principalmente en neuronas.

A nivel post-sináptico, el glutamato actúa sobre varios tipos de receptores, que reciben su denominación de acuerdo al tipo de agonista sintético al que responden. Estos receptores pueden ser ionotrópicos, como los sensibles a propionato de α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol (AMPA), a N-metil-D-aspartato (NMDA) y a kainato o bien receptores metabotrópicos. Las tres familias de receptores ionotrópicos de glutamato (AMPA, kainato y NMDA) fueron originalmente clasificadas por sus características farmacológicas y posteriormente por técnicas de biología molecular. En los receptores ionotrópicos, la unión del glutamato resulta en un cambio conformacional que permite el influjo de sodio y calcio a través de un canal. Estas tres

clases de receptores ionotrópicos para glutamato son complejos macromoleculares que contienen tres dominios transmembrana denominados M1, M3 y M4 y una porción reentrante en la membrana, el dominio M2, que confiere las distintas selectividades iónicas del canal. La estimulación de los receptores de tipo NMDA es responsable del incremento en la concentración de calcio intracelular y en condiciones de hiper-estimulación, de una cascada de eventos que puede desencadenar en muerte celular.

Además de los receptores ionotrópicos, el glutamato también se une a receptores metabotrópicos acoplados a proteínas G, modulando la producción de segundos mensajeros intracelulares y mediando efectos comparativamente más lentos. Hasta ahora se han identificado al menos 8 subtipos de receptores metabotrópicos de glutamato, y éstos a su vez han sido subclasificados en tres grupos, basados en la homología de su secuencia, su perfil farmacológico y su acoplamiento a mecanismos de señalización intracelular. El primer grupo está integrado por los subtipos mGluR1 y mGluR5, que activan a una fosfolipasa C, mientras que los miembros del segundo (mGluR2 y GluR3) y el tercer grupo (mGluR4, mGluR7 y mGluR8) están acoplados negativamente a la adenilato ciclasa. El receptor mGluR6 está acoplado a la activación de una fosfodiesterasa de GMPc y es específico de la retina (revisado por Yang, 2004).

Excitotoxicidad por glutamato

Particularmente en altas concentraciones, la participación del glutamato, en procesos de neurotoxicidad irreversible ha sido ampliamente demostrada. Se ha postulado que una liberación excesiva de glutamato constituye una de las principales causas de degeneración neuronal en procesos de injuria del sistema nervioso central (Rothstein y col., 1990; Ohtake y col., 2000). En particular en la retina, se ha demostrado que la incubación in vitro (en cultivos de células retinianas), así como la inyección intravítrea o intravenosa de concentraciones superiores a las fisiológicas de glutamato, induce muerte celular (Li y col., 1999). En diversos modelos

experimentales, se ha sugerido que la toxicidad inducida por ese aminoácido está mediada, al menos en parte, por receptores NMDA, ya que agonistas específicos de este receptor reproducen los efectos del glutamato (Sucher y col., 1997) y los antagonistas los bloquean (Pang, 1999; Toriu y col., 2000).

La toxicidad inducida a través de receptores NMDA es dependiente del influjo de Ca^{2+} extracelular. El aumento en la concentración de este catión actúa como un segundo mensajero que desencadena una cascada de eventos cuya consecuencia última puede ser la muerte celular, a través de un conjunto de mecanismos no completamente elucidados. El glutamato, luego de su interacción con receptores no-NMDA, estimula su propia liberación a través de un loop de feedback positivo. De esta forma, el Ca^{2+} induce la liberación de Ca^{2+} y un subsiguiente influjo de Ca^{2+} a través de canales dependientes del catión. Asimismo, otra posible consecuencia de la activación de este tipo de receptores a través de la entrada de Ca^{2+}, consiste en el aumento de la actividad de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) que cataliza la síntesis de óxido nítrico (NO) a partir de L-arginina (Vorwerk y col., 1997; Sattler y col., 1999; Bal-Price y col., 2001). Como se discutirá más adelante, altos niveles de NO pueden dar origen a peroxinitritos y otras especies reactivas con efectos deletéreos, que contribuyen a procesos degenerativos asociados a daño oxidativo. Diversas líneas de evidencia sugieren una relación causal entre el aumento en los niveles de glutamato y la apoptosis de las CGR en el glaucoma. En este sentido, se ha demostrado que la histopatología de la injuria glaucomatosa es marcadamente similar a la que se obtiene a través de la administración de concentraciones tóxicas de glutamato (Dreyer y col., 1996; Dreyer y Grosskreutz, 1997). Las concentraciones de glutamato en el humor vítreo son significativamente mayores en ojos de perros con glaucoma primario (Brooks y col., 1997) y en codornices mutantes con una patología similar al glaucoma (Dkhissi y col., 1999), así como en ojos glaucomatosos humanos (Vorwerk y col., 1999), comparado con sus respectivos controles. Sin embargo, en dos modelos experimentales de glaucoma en ratas (Levkovitch-Verbin y col.,

2002) y en monos (Carter-Dawson y col., 2002), el aumento en la concentración de glutamato en el vítreo no fue evidente.

A pesar del conjunto de evidencias mencionadas, la relación causal entre una disfunción en el metabolismo del glutamato y la muerte de las células ganglionares en el glaucoma es objeto de activa controversia. En trabajos previos de nuestro laboratorio, se examinó la actividad del ciclo glutamato/glutamina en retinas de ratas con hipertensión ocular inducida por AH. Los resultados obtenidos constituyen la primera demostración experimental de cambios significativos en el reciclado de glutamato en retinas de ojos con hipertensión ocular. En este sentido, se observó una disminución significativa en el influjo de glutamato y en la actividad de GS, así como un aumento en la liberación y el transporte de glutamina y en la actividad de glutaminasa retiniana a las 3 semanas de hipertensión ocular. Estos cambios podrían contribuir en forma sinérgica y/o redundante a un aumento significativo en las concentraciones sinápticas del neurotransmisor (Moreno y col., 2005b).

4. El GABA en la retina

El GABA desempeña un papel clave en el procesado de la 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 CGR. El GABA fue el primer compuesto que satisfizo todos los criterios para ser establecido como un neurotransmisor en la retina de vertebrados (Dowling, 1978; Massey y Redburn, 1987). Las neuronas GABAérgicas representan aproximadamente la mitad de las neuronas inhibitorias, y tres cuartas partes de las sinapsis inhibitorias de la retina de vertebrados son GABAérgicas. Un ejemplo de estos circuitos laterales inhibitorios son las células amácrinas que interactúan con células bipolares y ganglionares (Zhang y col., 2004). 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 la retina de conejo, la inmunorreactividad para GABA es muy escasa en células horizontales, y muy intensa en células amácrinas (Mosinger y col., 1986). De hecho, aunque se ha demostrado la presencia de GABA en procesos de células horizontales de retina de gato (Chun y Wassle, 1989), la evidencia de células horizontales GABAérgicas en primates y roedores aún es controversial. Se ha demostrado en retinas de ratas y ratones que el GABA participa en las sinapsis entre células interplexiformes (dopaminérgicas) y células de tipo AII (otro tipo de célula amácrina) que distribuye la señal de los bastones al sistema de conos (Contini y Raviola, 2003).

Se ha postulado que las células amácrinas GABAérgicas constituyen los principales componentes de la periferia de los campos receptivos de las células bipolares y las CGR. 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).

Al igual que en la sinapsis glutamatérgica, la finalización de la señal GABAérgica ocurre por la recaptación rápida del neurotransmisor liberado al espacio sináptico. Este proceso involucra 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 (denominados GAT-1, GAT-2 y GAT-3) en células GABAérgicas amácrinas e interplexiformes y en células de Müller (Johnson y col., 1996). 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 de hipocampo de rata (Vivar y Gutierrez, 2005).

Una vez recaptado, el catabolismo del GABA comienza con la enzima GABA-transaminasa (GABA-T) que cataliza la transferencia del grupo amino al α-cetoglutarato regenerando glutamato, su precursor ("shunt de GABA"). La GABA-T es una enzima mitocondrial que se localiza tanto en neuronas como en células gliales (revisado por Kalloniatis y Tomisich, 1999), (Figura 8).

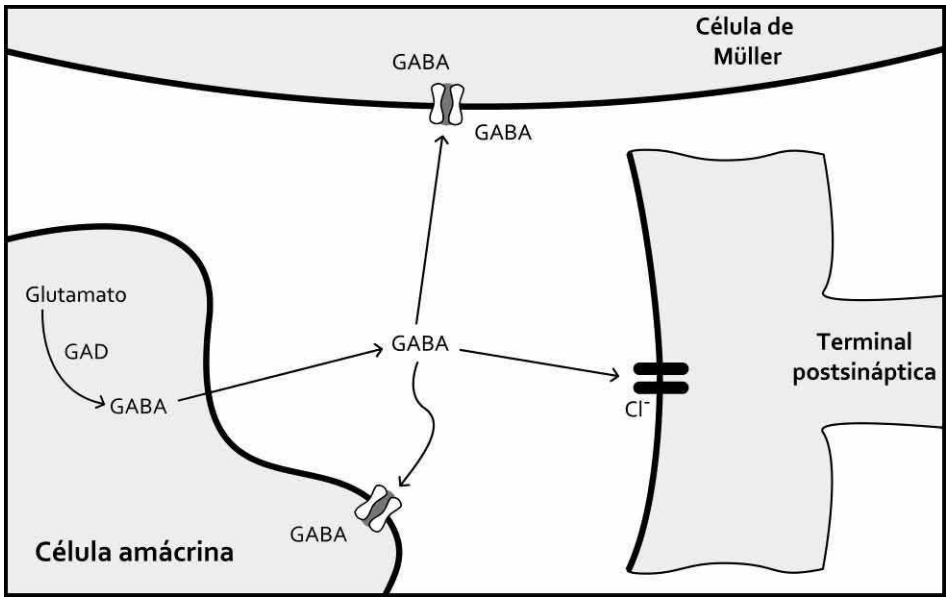

Figura 8. Representación esquemática del sistema GABAérgico retiniano. El GABA se sintetiza a partir de glutamato, en una reacción catalizada por la enzima glutámico descarboxilasa (GAD). Una vez liberado al espacio sináptico el GABA es recaptado a través de transportadores específicos al interior de las células de Müller o de la misma neurona donde puede ser reutilizado o metabolizado.

El GABA se sintetiza a partir de L-glutamato en una única reacción catalizada por la enzima glutámico 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 en el terminal axónico más que en el soma (Vaughn y col., 1981). Se ha descripto la presencia de dos isoformas de GAD (GAD-65 y GAD-67) en la retina de diversas especies (Johnson y Vardi, 1998; Andrade da Costa y col., 2003).

La liberación de GABA en retinas de vertebrados es un mecanismo altamente dependiente de la especie. Este proceso inducido por despolarización involucra dos mecanismos diferentes: uno dependiente de Ca^{2+} extracelular que ocurre por exocitosis de vesículas que contienen GABA y otro independiente de este catión, que ocurre a través de la reversión del transportador de GABA de alta afinidad (Schwartz, 1987). 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 de voltaje coincide con la del transportador y, además, los transportadores tienen una farmacología característica (revisado por Schwartz, 2002). Este mecanismo se ha descrito en células horizontales de retinas de pollo (Hofmann y Möckel, 1991; Duarte y col., 1993). 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).

Si bien tanto las altas concentraciones de K^{+} como el glutamato son maniobras despolarizantes, los mecanismos de acción involucrados en ambos casos son diferentes. Las concentraciones altas de K^{+} producen despolarización por el cambio de la fuerza motriz del principal ión permeable y no puede asumirse que afectan directamente a un carrier o un canal. El glutamato, en cambio, interactúa con canales de sodio. Aunque se observaron diferencias dependientes de la especie, la liberación de GABA inducida por glutamato ocurre mayoritariamente a través de un mecanismo independiente de Ca^{2+} y dependiente de Na^{+}, mientras que la liberación inducida por alto K^{+} es al menos parcialmente dependiente de Ca^{2+} (do Nascimento y col., 1998; López-Costa y col, 1999; Andrade da Costa y col., 2000).

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

$GABA_C$. Los receptores de tipo $GABA_A$ son complejos supramoleculares que conforman canales de Cl^- modulados por ligando, y están constituidos generalmente por 5 subunidades proteicas, que se expresan diferencialmente en distintas zonas del sistema nervioso central (SNC). La composición del complejo supramolecular determina las propiedades funcionales y farmacológicas del receptor (Mehta y Ticku, 1999). La respuesta GABAérgica de tipo A es reproducida por muscimol. Los receptores $GABA_B$ son proteínas transmembrana acopladas a proteínas G y a un sistema de segundos mensajeros que regulan canales de Ca^{2+} y/o K^+. Estos receptores son activados por baclofen (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. Estos canales, como los receptores de tipo $GABA_A$ son sensibles al bloqueo por picrotoxina (Bormann, 2000) y terbutil-ciclofosforotionato (TBPS). El TBPS es frecuentemente utilizado en estudios bioquímicos para analizar el estado funcional del canal de cloro asociado a los receptores de tipo $GABA_A$ (Uusi-Oukari y col., 2004).

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). Adicionalmente, se han localizado 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 $GABA_A$ en células amácrinas y ganglionares, tanto en retina de mamíferos como de no mamíferos, mientras que la existencia de receptores $GABA_C$ en estas últimas células es controversial (revisado por Yang, 2004).

Como ya se mencionara, el paradigma de la organización neuroquímica en la retina de vertebrados es que el glutamato es el neurotransmisor en la vía fotorreceptores → células bipolares → CGR, mientras que el GABA a nivel de las células amácrinas participa en la vía lateral, modulando la transmisión neuronal en ambas capas sinápticas (Kalloniatis y Tomisich, 1999; Yang 2004). Las neuronas retinianas de salida liberan glutamato, mientras que neuronas inhibitorias tónica o fásicamente activas (mayoritariamente GABAérgicas) crean una barrera al pasaje de la información a través de un circuito neuronal, lo que genera una resistencia contra la tendencia al disparo (en un equilibrio de tipo "Yin-Yang") que provoca niveles variables de actividad neuronal. El concepto prevalente es que el balance entre señales excitatorias e inhibitorias desempeña un rol clave en los mecanismos que modulan el mantenimiento de una variedad de funciones retinianas y la codificación de la información sensorial. De hecho, la pérdida de este balance puede provocar muerte celular. En trabajos previos de nuestro laboratorio, se examinó la actividad del sistema GABAérgico en retinas de ratas con hipertensión ocular inducida por AH. A las 3 semanas de hipertensión ocular, se observó una disminución significativa en el turnover de GABA, en la actividad de GAD y en la liberación de GABA, tanto inducida por glutamato como por altas concentraciones de K^+. Asimismo, se observó un aumento en el uptake de GABA y en la unión específica de TBPS en retinas de ojos inyectados con AH. Los cambios en el uptake de GABA y la unión específica de TBPS persistieron hasta la 6ta semana de tratamiento con AH (Moreno y col., 2008). Este conjunto de resultados sugieren que la hipertensión ocular produce un déficit en la actividad del sistema GABérgico retiniano.

5. El sistema de defensa antioxidante retiniano

La formación de especies reactivas del oxígeno (ROS), es decir, radicales libres y otras moléculas que pueden convertirse en radicales libres o que son oxidantes fuertes, es una consecuencia insoslayable del metabolismo celular. El O_2 tiene un rol central en la respiración

celular como aceptor final de la cadena de transporte de electrones a través de la cual se transforma en H_2O, pero una pequeña proporción del O_2 no se reduce completamente, generando ROS. De esta forma, el oxígeno puede reducirse sucesivamente a anión superóxido (O_2^-) al incorporar un electrón, a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al aceptar dos electrones y a radical hidroxilo ($OH^\bullet$) al aceptar tres electrones. Se ha estimado que entre 2 y 5 % del O_2 consumido en el metabolismo normal se transforma en ROS (Martínez- Sánchez y col., 2005). Los radicales libres pueden provocar modificaciones estructurales irreversibles en moléculas de gran relevancia biológica como lípidos, proteínas o ácidos nucleicos. El $OH^\bullet$ es el radical libre más deletéreo en los sistemas biológicos y puede reaccionar con casi todas las biomoléculas. La interacción de $OH^\bullet$ con ácidos grasos poliinsaturados de membranas biológicas, es un aspecto central del daño oxidativo celular. El radical lipídico que se forma por la reacción del $OH^\bullet$ con los lípidos se combina con otra molécula de oxígeno (reacción en cadena), proceso conocido como peroxidación lipídica, o puede unirse a otro radical lipídico para formar un complejo no reactivo a expensas de la unión cruzada de ácidos grasos de membrana, lo que provoca una disminución de su fluidez. Las ROS pueden inducir procesos apoptóticos, alterando la función mitocondrial, lo que puede desencadenar la liberación de citocromo c del interior de la mitocondria (Tezel y Yang, 2004). Como se mencionará en detalle más adelante, el daño oxidativo puede ser también provocado por especies reactivas de nitrógeno (RNS) como el NO, el radical dióxido de nitrógeno y los peroxinitritos. Además de los radicales libres formados endógenamente, el ambiente externo también puede generar “insultos oxidativos” como las radiaciones UV, que contribuyen al deterioro celular y al desarrollo de distintas enfermedades. Sin embargo, frente a estas formas de “agresión radicalaria”, los sistemas celulares disponen de mecanismos variados y normalmente eficientes para la protección contra la acumulación de estas especies reactivas, que constituyen mecanismos endógenos de protección a distintos niveles de organización celular. Por lo tanto, el “estrés oxidativo” es el desbalance entre los factores

oxidantes y el sistema de defensa antioxidante endógeno. Entre los mecanismos de defensa antioxidante, las actividades de superóxido dismutasa (SOD), catalasa y glutatión peroxidasa (GPx) cumplen un rol destacado. Las SODs son metaloenzimas de las cuales se han descripto 3 isoformas que se clasifican según el metal que utilizan como cofactor: Mn-SOD mitocondrial, Cu-Zn-SOD citosólica y Cu-Zn-SOD extracelular. La SOD cataliza la conversión de O_2^- en H_2O_2 y O_2, en una reacción catalizada por una de las enzimas de acción más rápida que se conoce. Aunque el H_2O_2 no es un radical libre, es una molécula altamente reactiva y permeable a membranas, que puede fácilmente convertirse en metabolitos del oxígeno altamente reactivos como el $OH^{\bullet}$. En condiciones normales, la mayoría de las moléculas de H_2O_2 generadas en la reacción catalizada por la SOD son ulteriormente metabolizadas a agua por la catalasa o la GPx (Figura 9).

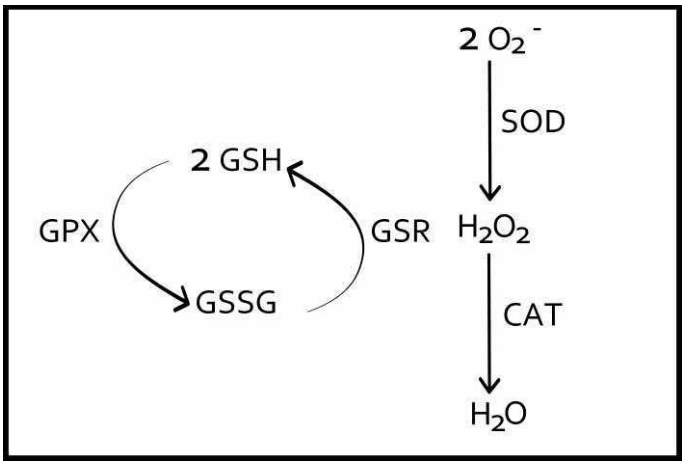

Figura 9. Sistema de defensa antioxidante endógeno. La superóxido dismutasa (SOD) cataliza la conversión de radicales superóxido (O_2^-) en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y O_2, lo que constituye la fase inicial de la defensa metabólica contra el estrés oxidativo. En condiciones normales, la mayoría de las moléculas de H_2O_2 generadas en la reacción catalizada por la SOD, son ulteriormente metabolizadas a agua (H_2O) por la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPx). GSR: glutatión reductasa, GSH: glutatión reducido y GSSG: glutatión oxidado.

La GPx que se puede localizar en mitocondrias o en citosol, cataliza la reducción de H_2O_2 u otros peróxidos (L-OOH), utilizando como agente reductor el glutatión reducido (GSH). Existen

al menos 3 isoformas de GPx cuya actividad depende de selenio. La catalasa, al igual que la GPx, puede degradar H_2O_2 y su localización celular es similar, pero sus mecanismos de regulación son diferentes. La GPx y la glutatión reductasa (GSR) se encuentran formando parte de un sistema antioxidante (GPx/GSR) y la catalasa de otro (SOD/CAT). Se ha demostrado que ambos sistemas no actúan a la par; la catalasa actúa en presencia de altas concentraciones de H_2O_2 y la GPx lo hace a concentraciones bajas, lo que sugiere una correlación inversa en la actividad de ambas enzimas (Nishida y col., 1996).

La retina es una estructura particularmente susceptible al daño oxidativo por su alto consumo de oxígeno (Alder y Cringle, 1985), su alta proporción de ácidos grasos poliinsaturados (Militante y Lombardini, 2004) y su exposición directa a luz visible (Dorey y col., 1990; Cruickshanks y col., 1993; Yusifov y col., 2000). Por lo tanto, no resulta sorprendente que el daño oxidativo haya sido involucrado en diversas enfermedades retinianas. En modelos de diabetes, se ha observado una disminución de la actividad de enzimas que protegen contra el daño por ROS (Dene y col., 2005), así como un aumento de la peroxidación lipídica y ruptura mitocondrial con liberación de citocromo c y de proteínas pro-apoptóticas (Kowluru y Abbas, 2003). En la retinopatía del prematuro se observó una disminución en los niveles de GSH (Papp y col., 1999) y de vitamina E (Chan y col., 1999).

En cuanto al vínculo entre el estrés oxidativo y el glaucoma, se ha demostrado que los niveles de productos de peroxidación lipídica aumentan más de dos veces en el humor acuoso de pacientes con glaucoma (Kurysheva y col., 1996) y que el nivel de la actividad total antioxidante del humor acuoso es significativamente menor. Asimismo, se ha descripto una disminución de la actividad del sistema de defensa antioxidante endógeno en etapas tempranas de glaucoma primario de ángulo abierto (Bunin y col., 1992). Estudios en pacientes demostraron una alteración a nivel mitocondrial compatible con daño oxidativo (Abu-Amero y col., 2006). En animales con glaucoma experimental se ha propuesto que cambios en el estado rédox podrían

alterar el estado de oxidación de proteínas y enzimas, causando un daño neuronal y glial irreversible (Tezel, 2006). Experimentos farmacológicos han llevado a sugerir que la isquemia ocular, inducida por el aumento de la PIO en el conejo provoca estrés oxidativo responsable de la alteración funcional retiniana (Muller y col., 1997). En trabajos previos de nuestro laboratorio se ha demostrado un déficit significativo en la capacidad antioxidante retiniana en el modelo de glaucoma experimental inducido por AH. En este sentido, se demostró una disminución significativa en la actividad de catalasa y SOD y de los niveles de GSH en retinas de ojos hipertensos. Si bien los mecanismos involucrados en los cambios observados son aún elusivos, es muy probable que la disminución de estas actividades enzimáticas provoque un desbalance en el sistema de defensa antioxidante. Esta hipótesis es avalada por el incremento en la peroxidación lipídica retiniana, que aumentó significativamente en forma dependiente del tiempo de hipertensión ocular. Asimismo, los niveles retinianos de melatonina disminuyeron significativamente en ojos inyectados con AH ya a partir de las 3 semanas de tratamiento (Moreno y col., 2004).

6. El óxido nítrico en la retina

El NO es un gas incoloro que posee un electrón desapareado, y por lo tanto es una molécula altamente reactiva. Una gran variedad de evidencias experimentales demuestran de manera concluyente que el NO desempeña un rol relevante en la fisiología del SNC, del sistema cardiovascular y del sistema inmune (Ignarro y col., 1990; Bredt y col., 1991; Brenman y Bredt, 1996; Stuehr, 1999; Bishop y Anderson, 2005). El NO se sintetiza a partir de L-arginina en una reacción catalizada por la NOS que da como producto citrulina, además de NO, y requiere de la presencia de calmodulina y de 4 cofactores: flavina mononucleótido, flavina adenina dinucleótido, tetrahidrobiopterina y nicotiamida-adenina dinucleótido fosfato (NADPH).

Hasta el presente, se han descripto tres isoenzimas con la capacidad de catalizar esta reacción, la NOS neuronal o NOS-1, la NOS inducible o NOS-2 y la NOS endotelial o NOS-3. Estas isoenzimas difieren en su estructura y en los mecanismos regulatorios de su actividad (Bredt y Snyder, 1994; Khatsenko y Kikkawa, 1997). Las isoformas neuronal y endotelial dependientes de calcio/calmodulina se localizan en el citosol y se activan en respuesta a un aumento en la concentración de calcio intracelular. La iNOS es inducida por la liberación endógena de citoquinas proinflamatorias y endotoxinas, entre otros estímulos, y cataliza la síntesis de altas concentraciones de NO.

Aunque no se conoce completamente la distribución de las isoformas de NOS en los distintos tipos celulares de la retina, algunos resultados indican que se encuentran presentes en varios subtipos de cada una de los tipos celulares que la integran.

La NOS puede ser inhibida total o parcialmente por derivados estructurales de la L-arginina como la N-mono-metil-L-arginina (L-NMMA) y la N-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME). La participación del NO en diversos procesos retinianos, tanto fisiólogos como patológicos ha recibido considerable aval experimental. En este sentido, se ha demostrado que el NO participa en la regulación basal del flujo sanguíneo en respuesta a condiciones de estrés fisiológico (Koss 1999) y la supresión de la producción de este compuesto reduce el flujo sanguíneo de la coroides. Diversos estudios demuestran la activación de NOS retiniana en condiciones de daño celular, como la isquemia (Ostwald y col., 1995) y la retinopatía diabética (Tilton y col., 1993). La inhibición de la actividad de NOS provee protección parcial aunque significativa, frente a los efectos deletéreos del glutamato sobre las células retinianas, lo que avala la participación del NO en la neurotoxicidad glutamatérgica (Takahata y col., 2003).

La L-arginina necesaria para la síntesis de NO es captada desde el espacio extracelular por transportadores de membrana. Se han identificado cuatro sistemas de transporte para L-arginina denominados y+, b(°,+), B(°,+) e y+L (Devés y Boyd, 1998). Sólo uno de ellos (el transportador

de tipo y+) es selectivo para aminoácidos catiónicos e independiente de sodio. En la retina de rata, se ha demostrado que el transporte de L-arginina ocurre a través de un sistema con características compatibles con el sistema y+ (Carmo y col., 1999). El mismo tipo de transportador fue identificado en varios tejidos, incluida la retina de hámster (Sáenz y col., 2002).

En muchos aspectos, el NO es una molécula con características peculiares dado que no involucra los mecanismos clásicos de transporte, metabolización, liberación, y acción biológica común a otros sistemas de transducción de señales. A diferencia de éstos, el NO difunde libremente a través de membranas biológicas, tiene una corta vida media y su acción biológica, más que para cualquiera de las señales conocidas, está directamente relacionada con su reactividad química. En este contexto, se han propuesto diversos targets moleculares de la acción del NO, como hemo-proteínas, proteínas con hierro no-hémico y proteínas hierro-sulfuradas, entre otras. Una de las moléculas blanco centrales del NO es la guanilato ciclasa soluble, enzima que cataliza la síntesis de GMPc a partir de GTP. Además de este mecanismo de acción canónico, el NO participa en procesos independientes de GMPc, mediados por la interacción de especies reactivas de nitrógeno con residuos reducidos de cisteína de proteínas formando S-nitrosocisteínas (Martínez-Ruiz y Lamas, 2004). Este proceso constituye una modificación post-traduccional significativa, con consecuencias funcionales para la actividad proteica (revisado por Stamler y Meissner, 2001). Cuando estos residuos tiólicos están estratégicamente ubicados y son inactivados por S-nitrosilación o formación de derivados sulfinamidas pueden comprometer seriamente la actividad de la proteína. En la última década, el número de sustratos de S-nitrosilación ha llegado a más de la centena (Stamler y Meissner, 2001), lo que es consistente con la ubicuidad de sitios tiólicos activos y/o regulatorios en distintas clases de proteínas. El glutatión es un antioxidante esencial, necesario para la protección celular contra el daño oxidativo. La reactividad del NO con el grupo tiol del glutatión (Wong y col., 1998) podría

provocar una caída en los niveles de GSH y con ello, aumentar la vulnerabilidad frente a otros oxidantes (Väänänen y col., 2003). Por otra parte, el NO puede interactuar con O_2^- en una reacción radical-radical que genera el anión peroxinitrito ($ONOO^-$), un potente oxidante que puede provocar toxicidad directamente o descomponerse en otros productos tóxicos, que incluyen al radical $OH^\bullet$. Además, el NO puede modular la actividad de varias proteínas que contribuyen a la apoptosis (Melino y col., 1997) y puede contribuir a la muerte de CGR a través de la activación de metaloproteasas (Manabe y col., 2005).

Diversas líneas de evidencia sugieren la participación del NO en la patogénesis del glaucoma. En este sentido, se ha postulado que en la cabeza del nervio óptico glaucomatoso, niveles excesivos de NO podrían ser responsables, al menos parcialmente, de la degeneración axonal de las CGR (Morgan, 2000). Asimismo, se ha demostrado un aumento en la expresión de la isoforma nNOS en retina de ratas con glaucoma (Park y col., 2007) y en astrocitos de la región prelaminar y de la lámina cribosa en pacientes con glaucoma (Liu y col., 2000). Neufeld y col. (1999) demostraron que la aminoguanidina, un inhibidor relativamente específico de la iNOS reduce la excavación de la cabeza del nervio óptico en un modelo experimental de glaucoma en ratas inducido por la cauterización de las venas epiesclerales. Si bien este resultado constituye una evidencia en favor de la participación de la iNOS en la retinopatía glaucomatosa, en forma más reciente, utilizando métodos inmunohistoquímicos, de gene array y RT-PCR cuantitativa se ha descartado la posibilidad de que la hipertensión ocular induzca un aumento en la expresión de esta isoforma en un modelo de glaucoma inducido por inyección de solución salina hipertónica en las venas epiesclerales, ni en pacientes con glaucoma de ángulo abierto (Pang y col., 2005). De hecho, en este mismo trabajo, los autores no observaron efectos significativos del tratamiento con aminoguanidina en el glaucoma experimental en ratas. En otros modelos de enfermedades retinianas como la retinopatía diabética (Du y col., 2004), la uveítis (Liversidge y col., 2002) y la

isquemia (Neufeld y col., 2002) se ha observado un aumento significativo en la expresión de iNOS.

7. La melatonina en la retina

La melatonina, originalmente descrita por Lerner y col. en 1959, fue considerada durante mucho tiempo de origen exclusivamente pineal (Lerner y col., 1959; Axelrod, 1974). Por su alta lipofilicidad la melatonina pineal podría acceder fácilmente al ojo por vía sistémica (Bubenik y col., 1978; Cassone y col., 1993) y por consiguiente, la concentración ocular de melatonina podría depender de la secreción glandular. Sin embargo, múltiples pruebas experimentales demuestran que la melatonina es sintetizada en la retina de diversas especies (Quay, 1965; Cardinali y col., 1971; Gern y Ralph, 1979; Pang y col., 1993; Faillace y col., 1995). La melatonina retiniana fue localizada mediante el desarrollo de un antisuero anti-melatonina y anti-N-acetilserotonina en la CNE de la retina de rata donde se localizan los somas de los fotorreceptores (Bubenik y col., 1974; Pang y col., 1977). Mediante el uso de anticuerpos específicos, se determinó la presencia de melatonina en la capa de fotorreceptores de la retina de hámster, ratón, codorniz, reptiles y peces (Grota y Brown, 1974; Bubenik, 1978; Vivien-Roels y col., 1981). Asimismo, en cultivos retinianos de pollo se demostró una alta correlación entre el número de fotorreceptores y la actividad de la arilalquilamina N-acetil transferasa (AA-NAT), enzima limitante en la síntesis de melatonina (Iuvone y col., 1990). Si bien este conjunto de evidencias indican que la melatonina es principalmente sintetizada en los fotorreceptores, trabajos de nuestro laboratorio indican que el metoxiindol puede ser sintetizado también en células ganglionares de la retina de pollo (Garbarino-Pico y col., 2004).

La biosíntesis de melatonina, tanto en la glándula pineal como en la retina, comienza con la captación del triptofano circulante que luego se convierte 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 la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos. 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 AA-NAT. Subsecuentemente, la hidroxiindol-O-metiltransferasa (HIOMT) cataliza la transferencia del grupo metilo de la S-adenosilmetionina a la posición 5-hidroxi de la N-acetilserotonina, dando melatonina como producto final (Figura 10) (Ebadi y Govitrapong, 1986).

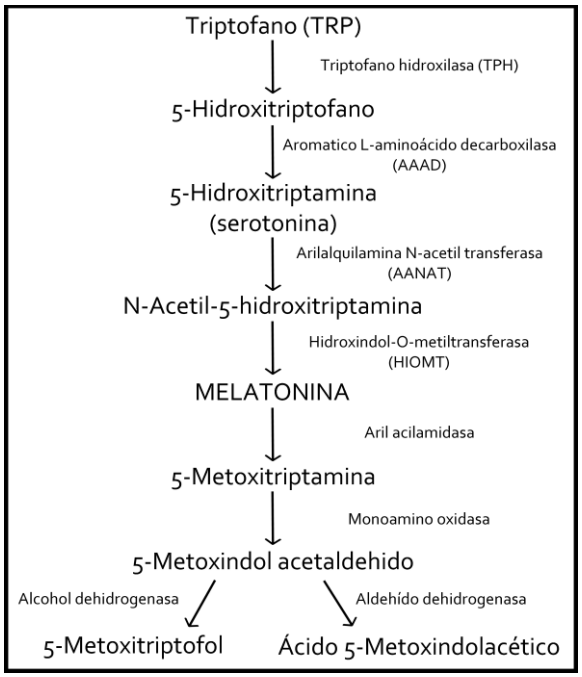

Figura 10. Síntesis de melatonina

La melatonina no se acumula dentro de la célula, sino que difunde libremente debido a su alta lipofilicidad. En la retina de Xenopus se ha demostrado que la melatonina retiniana puede ser metabolizada a nivel local (Cahill y Besharse, 1989; Li y col., 1997) a través de la desacetilación a 5-metoxitriptamina (Grace y col., 1991), pero aún no se han obtenido evidencias similares en otras especies.

Existen sólidos indicios en favor de que el AMPc es el segundo mensajero clave en la biosíntesis de melatonina, tanto en la glándula pineal como en la retina (Iuvone y Rauch, 1983; Zawilska y Nowak, 1992; Nowak y Wawrocka, 1993). Una cantidad considerable 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 AA-NAT (Klein y col., 1997; Iuvone y col., 1999; Ivanova y col., 2003).

Una característica central de la biosíntesis de melatonina, tanto en la pineal como en la retina de diversas especies, es su marcada variación a lo largo del ciclo de luz/oscuridad, con valores máximos en la fase nocturna. La regulación de la biosíntesis de melatonina es sensible a la luz y la oscuridad; sin embargo, se ha demostrado que un oscilador circadiano endógeno regula paralelamente este proceso en la retina de *Xenopus* (Cahill y Besharse, 1993). En trabajos previos de nuestro laboratorio, se ha demostrado por primera vez que la retina de hámster es un sitio de síntesis activa de melatonina, independiente de la glándula pineal, y regulada por la información fótica (Faillace y col., 1994) y más tarde, otros autores, demostraron que la biosíntesis de melatonina en la retina de esta especie es también regulada por un reloj circadiano local (Tosini y Menaker, 1996).

La melatonina ha sido involucrada en la regulación de una gran variedad de procesos circadianos. La duración del pico nocturno de los niveles de melatonina plasmática responde al fotoperíodo y juega un papel central en aquellas especies que poseen regulación estacional de la capacidad reproductiva, uno de los efectos más claramente asociados a la acción de este metoxiindol. Además, entre otras muchas funciones, la melatonina sérica se ha vinculado a los cambios anuales en el peso corporal, el color y la calidad del pelaje en diversas especies (revisado por Brandstätter, 2003).

En la retina, la melatonina actúa como un neuromodulador autócrino o parácrino que podría regular la fisiología circadiana local (Pierce y Besharse, 1988; Iuvone y col., 1999; Tosini, 2000). La melatonina inhibe la liberación de dopamina (Dubocovich, 1983) y de acetilcolina (Mitchell y Redburn, 1991) en las células amácrinas y estimula la liberación de glutamato en fotorreceptores (Faillace y col., 1996a), activa el shedding y la fagocitosis de los discos de

membrana de los segmentos externos de los fotorreceptores (Besharse y Dunis, 1983), promueve los movimientos fotomecánicos de adaptación a la oscuridad en fotorreceptores y en el epitelio pigmentario de la retina de distintas especies (Pierce y Besharse, 1987), afecta la supervivencia celular (Iuvone y col., 1999) y modula la sensibilidad visual (McGoogan y Cassone, 1999). Además, la melatonina inhibe la producción de AMPc en la retina de hámster y de pollo (Faillace y col., 1994; Valenciano y col., 2000). En trabajos previos de nuestro laboratorio, se ha demostrado que la melatonina aumenta los niveles retinianos de GMPc en el hámster (Faillace y col., 1996b). Por otra parte, se ha observado que este metoxiindol disminuye la onda c del electrorretinograma (Textorius y Nilsson, 1987) y puede afectar el potencial de membrana del epitelio pigmentario de retina de pollo directamente o a través de las células retinianas o de la coroides (Nao-i y col., 1989). Además, se detectaron niveles de melatonina en humor acuoso con un ritmo circadiano con niveles mayores durante la noche (Yu y col., 1990; Liu y col., 1991), y se ha postulado que el ritmo circadiano de la PIO podría estar regulado por melatonina (Chiou y McLaughlin, 1984; Samples y col., 1988; Liu y Dacus, 1991).

La variedad de funciones de la melatonina puede ser atribuida a la existencia de subtipos de receptores (Dubocovich y col., 1999). Estudios inmunohistoquímicos en ojos de distintas especies demostraron la presencia de receptores para melatonina de tipo 1 y 2 (MT_1, MT_2) en la córnea, la coroides, la esclera, los fotorreceptores, las CGR y los vasos retinianos (Fujieda y col., 1999; Scher y col., 2002, 2003; Savaskan y col., 2002; Wiechmann y Smith; 2001; Wiechmann, 2003; Rada y Wiechmann, 2006).

Múltiples evidencias demuestran que la melatonina, siendo una molécula altamente lipofílica, podría participar en funciones pleiotrópicas, no mediadas por receptor. En este contexto, sólidas 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; Siu y col., 2006). En este sentido, se ha demostrado que la melatonina aumenta la

actividad de GPx (Barlow-Walden y col., 1995) y los niveles de ARNm de SOD (Antolin y col., 1996), y reduce la peroxidación lipídica inducida por lipopolisacárido (Sewerynek y col., 1995) y el daño oxidativo en animales tratados con fenobarbital (Sewerynek y col., 1995). En particular en la retina, se ha demostrado que la melatonina protege a las células retinianas de la peroxidación lipídica (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 $OH^{\bullet}$. Además de la melatonina, varios de los metabolitos generados como resultado de su acción como scavenger son también antioxidantes (Hardeland, 2005).La melatonina es capaz de reaccionar en forma directa con NO para dar al menos un producto estable que fue caracterizado por espectroscopía RMN y Rayos X (Turjanski y col., 1998). Asimismo, en trabajos previos de nuestro laboratorio se ha demostrado 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 NOS y el efecto de la L-arginina en la retina de hámster (Sáenz y col., 2002). Se ha demostrado que la melatonina inhibe la expresión de la iNOS y protege contra el daño oxidativo en modelos experimentales en los que el NO es causa de destrucción molecular (Cuzzocrea y col., 1997). En nuestro laboratorio, se ha demostrado que la melatonina modula significativamente la actividad del ciclo glutamato/glutamina en la retina de hámster (Sáenz y col., 2004).

8. Condicionamiento Isquémico

El daño isquémico es un componente central de diversas enfermedades retinianas (la retinopatía diabética, la retinopatía por hipertensión arterial, la trombosis de la vena central de la retina, e incluso el glaucoma), que constituyen las causas más frecuentes de ceguera irreversible. No se

dispone actualmente de recursos eficaces para la prevención o terapéutica del daño isquémico retiniano debido a diversos obstáculos que han limitado el desarrollo de agentes neuroprotectores. Uno de ellos es el tiempo, un determinado tratamiento debería ser administrado en una ventana temporal estricta respecto al acontecimiento isquémico, lo que resulta frecuentemente impracticable en la clínica; en segundo lugar, las alternativas examinadas hasta ahora han demostrado una protección incompleta, con riesgo de efectos inespecíficos y/o adversos. Frente a esta vacancia terapéutica, se ha sugerido como estrategia alternativa o complementaria, la inducción de mecanismos endógenos de protección. El precondicionamiento isquémico (PCI) es un mecanismo de resistencia frente a una injuria isquémica seguida de reperfusión, que se produce como consecuencia de la aplicación previa de un insulto isquémico moderado/subumbral y breve. El PCI fue originalmente descripto en el miocardio en 1986 (Murry y col., 1986) y desde entonces se han demostrado fenómenos similares en diversos sistemas, como riñón, hígado y cerebro (Pasupathy y Homer-Vanniasinkam, 2005; Gidday, 2006). El PCI retiniano se demostró por primera vez en 1998 (Roth y col., 1998), un hallazgo tardío en comparación con las evidencias obtenidas más de diez años antes en otros tejidos. El PCI desencadena reacciones adaptativas a nivel celular que protegen al tejido frente al daño isquémico (Gidday, 2006). El PCI no sólo activa mecanismos que contrarrestan la cascada de eventos deletéreos, sino también contribuye a “reprogramar” la respuesta a la isquemia (Gidday, 2006). Cuando se exponen retinas a una isquemia prolongada por aumento de la PIO por encima de la presión sistólica arterial (~120 mmHg) durante 45 - 60 min, se produce una caída de la actividad electrorretinográfica y una alteración notable e irreversible de la estructura retiniana a los 7 días de la isquemia (tiempo necesario para evidenciar las consecuencias celulares del daño isquémico). Si entre 24 y 72 h antes del episodio isquémico se exponen las retinas a un aumento de la PIO de la misma magnitud pero durante períodos cortos (5 min), se observa un efecto protector histológico y funcional significativo, que puede llegar incluso a la protección completa

(Roth y col., 1998; Ozbay y col., 2004). Si bien una isquemia breve constituye el estímulo prototípico de PCI, es posible inducir tolerancia isquémica por exposición a estímulos endógenos o exógenos de naturaleza no isquémica, de forma tal que un determinado estresor puede inducir "tolerancia cruzada" respecto a un estresor de distinta naturaleza (Gidday, 2006). La naturaleza variada de estímulos capaces de inducir un fenotipo resistente sugiere que las vías de transducción de señales involucradas podrían converger en un mecanismo común, finalmente responsable de la tolerancia isquémica. En nuestro laboratorio se ha demostrado que una inflamación ocular moderada inducida por inyección intravítrea de 1μg de LPS provoca un efecto protector funcional e histológico altamente significativo frente a una isquemia deletérea inducida 24 h post-inyección de LPS (Franco y col., 2008). Otro aspecto de interés es la demostración de que una isquemia subumbral en un determinado tejido puede inducir tolerancia isquémica en otro (Tapuria y col., 2008). Por ejemplo, un torniquete breve en los miembros inferiores (Selimoglu y col., 2008) o el ejercicio físico (Ding y col., 2004) proveen protección frente a la isquemia en distintos tejidos. Este fenómeno ha recibido la denominación de PCI remoto (PCIR), y sugiere la participación de señales humorales o neurales que se transmiten desde el área en la que se aplicó el estímulo precondicionante hasta el tejido sometido a injuria isquémica. Aunque aún se desconoce su naturaleza, estas señales son capaces de atravesar la barrera hemato-encefálica (y eventualmente también la barrera hemato-ocular), dado que el PCIR es efectivo incluso en el cerebro (Ren y col., 2008). Al presente, no se dispone de evidencias acerca de la inducción de tolerancia isquémica retiniana luego de la aplicación de estímulos remotos. Si bien el PCI podría constituir una herramienta clínica en la atenuación de los efectos deletéreos inducidos por isquemia/reperfusión, es indudable que la posibilidad de inducir protección con una manipulación posterior al evento isquémico, amplificaría notablemente su potencialidad clínica. Se ha examinado la posibilidad de inducir mecanismos protectores a posteriori del episodio de isquemia/reperfusión, es decir, mecanismos de post-

condicionamiento isquémico (PostC). El PostC consiste en la aplicación de ciclos breves de isquemia/reperfusión durante la reperfusión que sigue a un insulto isquémico prolongado (Yellon y Hausenloy, 2005). Se ha demostrado que el PostC en el miocardio puede ser tan eficaz como el PCI en reducir el tamaño del infarto (Granfeldt y col., 2009). En forma más reciente, se demostró que el PostC es efectivo aún cuando se aplica en áreas distantes al tejido que fue previamente dañado por isquemia, lo que se denomina PostC remoto (PostCR) (Saxena y col., 2010). No se dispone de antecedentes que avalen la eficacia del PostCR en la protección frente al daño isquémico retiniano. Sin embargo, en trabajos recientes de nuestro laboratorio se ha demostrado por primera vez la efectividad del PostC en la protección de la retina frente al daño isquémico (Fernandez y col., 2009). En este sentido, se demostró que 7 pulsos de isquemia/reperfusión (1 min/1 min) (inducidos por aumento de la PIO hasta 120 mmHg) protegen la función y la histología retiniana aún cuando se aplican hasta 60 min después de una isquemia deletérea (Fernandez y col., 2009). Asimismo, se ha demostrado que el daño isquémico retiniano involucra un aumento en las concentraciones sinápticas de glutamato y que el PostC protege la retina del daño isquémico agudo disminuyendo las concentraciones sinápticas de este neurotransmisor. Considerando la efectividad del PCI y el PostC en la protección de la retina frente a un daño isquémico agudo, uno de los objetivos de esta Tesis Doctoral fue analizar el efecto de la inducción de tolerancia isquémica como recurso terapéutico frente al daño inducido por glaucoma experimental.

9. Neurotomía óptica radial (NOR)

La oclusión de la vena central de la retina (OVCR) es el segundo desorden vascular retiniano después de la retinopatía diabética, que usualmente provoca una discapacidad visual, especialmente en pacientes que sufren una OCVR de tipo isquémico (The Central Vein Occlusion Study Group, 1997). La OVCR puede resultar en una pérdida unilateral de la visión

debido a una hemorragia intrarretinal extensa, edema e isquemia retiniana. La formación de trombos en la lámina cribosa puede ser un evento primario o secundario en la OCVR (Green y col., 1981; Hayreh, 1971). A pesar de que la primera descripción de la OVCR fue en 1878, los distintos enfoques terapéuticos siguen siendo poco alentadores (von Michel, 1878). En el 2001, Opremcak y col. (2001) postularon que la OVCR es un síndrome compartimental, como resultado de una mayor presión sobre la vena central de la retina dentro del espacio cerrado del anillo escleral. Para relajar esta compresión neurovascular, estos autores propusieron un nuevo tratamiento quirúrgico, que consiste en la disección de la lámina cribosa transvítrea a través de una incisión radial en el lado nasal del nervio óptico para mejorar el flujo venoso (es decir, neurotomía óptica radial (NOR), Figura 11). En este estudio piloto, los autores demostraron una mejoría media de la agudeza visual de cinco líneas después de un seguimiento de 9 meses en 8 de 11 pacientes, mientras que sólo dos pacientes empeoraron (Opremcak y col., 2001). En el 2006, el mismo grupo informó de 117 casos tratados con NOR y 63 casos tratados con NOR junto con la inyección intravítrea de triamicinolona, en quienes se logró un aumento de dos o más líneas para el 78% y 64% de los pacientes, respectivamente (Opremcak y col., 2006 a y b). Otros investigadores confirmaron mejoras en la agudeza visual por este tratamiento quirúrgico. Aunque la incisión y el sitio de la NOR, así como el uso de una lanceta microvitreorretinal especialmente diseñada para la NOR podrían reducir al mínimo cualquier daño en las venas o en las fibras nerviosas, no se puede descartar por completo alguna complicación en el curso de la cirugía. De hecho, se han descripto una variedad considerable de efectos adversos de la NOR como un daño en la arteria central de la retina provocando una reducción aún mayor en el flujo sanguíneo retiniano peripapilar en el sitio de la incisión, desprendimiento de retina en el sitio de la NOR, daño en los axones del nervio óptico, disminución del campo visual, y un desprendimiento focal hemorrágico del epitelio pigmentario, así como la neovascularización coriorretiniana en el sitio de la NOR (Samuel y col., 2003; Williamson y col., 2003; Horio y

Horiguchi, 2005; Martinez-Jardon y col., 2005; Schneider y col., 2005; Yamamoto y col., 2005). Sobre la base de estas evidencias, existe aún una activa polémica respecto a las eventuales ventajas terapéuticas de la NOR, particularmente para el tratamiento de la OCVR, específicamente relacionadas con la relación "costo-beneficio" de este abordaje quirúrgico. Al presente, no se dispone de antecedentes respecto al uso de la NOR como tratamiento quirúrgico para el tratamiento del glaucoma, lo que constituye uno de los objetivos de este trabajo de Tesis Doctoral.

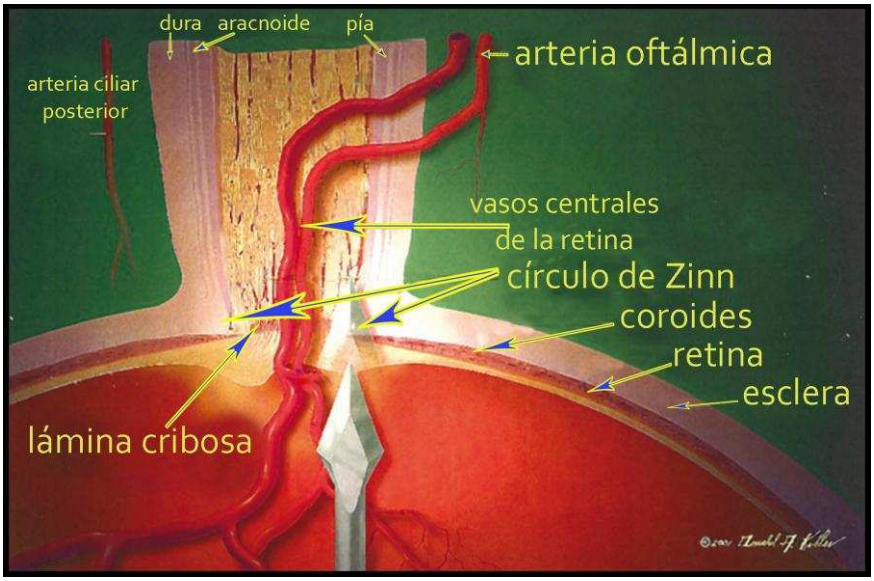

Figura 11. Representación esquemática de la NOR. Nótese la configuración anatómica de "cuello de botella" de la salida de la esclera a nivel de la lámina cribosa y el anillo escleral. Se muestra una hoja microvitreoretinal superpuesta en el lugar de la NOR. Modificado de Opremcak y col., 2001.

Sobre la base de las consideraciones mencionadas en la Introducción, los objetivos centrales de este trabajo de Tesis fueron:

- Estudiar la actividad del sistema nitrérgico retiniano en ratas con glaucoma experimental inducido por inyecciones intracamerales de ácido hialurónico.
- Estudiar el efecto de la melatonina sobre la actividad de los sistemas glutamatérgico, GABAérgico, nitrérgico y antioxidante en retinas de ojos de ratas control.
- Examinar el efecto de la melatonina sobre las alteraciones funcionales e histológicas inducidas por la hipertensión ocular crónica.
- Desarrollar un modelo experimental de glaucoma en ratas a través de inyecciones intracamerales de condroitín sulfato (CS).
- Examinar el efecto de la inducción de tolerancia isquémica en un modelo de glaucoma experimental en ratas inducido por CS.
- Analizar los cambios funcionales e histológicos tempranos de la neurotomía óptica radial (NOR) en ojos de rata normal.
- Evaluar el efecto de la NOR sobre el daño funcional e histológico inducido por hipertensión ocular crónica.

1. Animales

1.1. Ratas

Se utilizaron ratas Wistar macho adultas (peso promedio: 250 ± 50 g) mantenidas con agua y comida ad libitum, en un ambiente controlado de temperatura (21 ± 2ºC) y humedad. El bioterio fue iluminado con luz fluorescente, que se apagaba y prendía automáticamente cada 12 horas, (luz de 7 a.m. a 7 p.m.). En todos los procedimientos de manipulación y sacrificio de 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). Las inyecciones intravítreas, la implantación del pellet de melatonina, así como el sacrificio de los animales por decapitación se realizaron entre las 10.00 y las 12.00 h.

2. Administración intracameral de ácido hialurónico (AH) o condroitín sulfato (CS)

Las ratas se anestesiaron con una inyección intraperitoneal de hidrocloruro de ketamina (150 mg/kg) e hidrocloruro de xylazina (2 mg/kg). Con agujas 30-G, se inyectaron 25 μl de ácido hialurónico (AH) (10 mg/ml, en solución salina) ó 20 μl de condroitín sulfato (CS) (400 mg/ml) en un ojo, y en el ojo contralateral, el mismo volumen de solución fisiológica. Para ello, los ojos fueron enfocados bajo un microscopio quirúrgico Colden, con luz coaxial. Las inyecciones se realizaron luego de aplicar una gota de hidrocloruro de proparacaína al 0,5% en cada ojo. Se movió la aguja a través del limbo corneoscleral 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 (Figura 12). Las inyecciones se realizaron una vez/semana usando la fuerza necesaria para vaciar el contenido de la jeringa de tuberculina (ajustado a 25 ó 20 μl). El sitio de inyección fue el limbo corneoscleral, comenzando en la hora 12 y cambiando el sitio de la inyección de hora en hora para evitar la formación de pannus y rotando el animal para lograr mejor acceso al limbo.

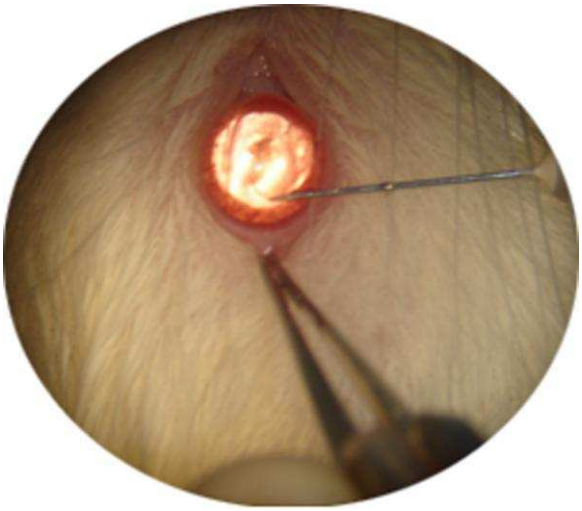

Figura 12. Inyección de AH o CS en la cámara anterior del ojo de rata.

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. Durante el tiempo en que los animales estuvieron anestesiados, se colocó gel sobre los ojos para evitar la sequedad corneal. No se observaron diferencias en la incidencia de las complicaciones oculares entre los grupos inyectados con vehículo, AH o CS. Como control del efecto de las inyecciones per se, se utilizó un grupo de animales que se manipuló y anestesió durante 10 semanas, pero no se aplicaron inyecciones intracamerales. En algunos experimentos, el CS se inyectó en forma bilateral y en los animales control se inyectó vehículo en ambos ojos.

3. Determinación de la presión intraocular

La presión intraocular (PIO) se determinó mediante un TonoPen XL (Figura 13) (Mentor, Norwell, MA) en ratas conscientes según la técnica descripta por Moore y col. (1995). Los animales se envolvieron suavemente con una toalla, sin provocar estasis venosa ni efectos valsalva, y mientras un operador lo mantenía firme, otro realizaba la determinación. Se obtuvieron cinco lecturas de cada ojo, omitiendo las que se registraban cuando el aparato no

estaba en contacto firme con la córnea. La variación entre lecturas 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 se promedió con las del resto de los animales del mismo grupo y el valor promedio resultante se registró como la PIO media del grupo ± error estándar (EE). No se observaron diferencias significativas entre el ojo derecho y el ojo izquierdo en animales intactos o inyectados con vehículo. 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.

Figura 13. Determinación de la PIO en ratas

4. Estudio del sistema nitrérgico

4.1. Determinación de la actividad de NOS

La actividad retiniana de NOS se determinó a través de la conversión de L-^{3}H-arginina en L-^{3}H-citrulina, según el método descripto (Weinberg y col., 1995). Las retinas se homogeneizaron en 100 μl de buffer conteniendo sacarosa 0,32 M, EDTA 0,1 mM e inhibidores de proteasas ajustado a pH 7,4. Alícuotas de 50 μl de los homogenatos se incubaron por 30 min a 37°C en presencia de 50 μl de buffer conteniendo 20 mM de HEPES, 6 mM de $CaCl_2$, 2 mM de NADPH, 10 μM de FAD y L-^{3}H-arginina (5 μCi/ml) y 2 μM de L-arginina. Luego de la incubación, se

frenó la reacción por el agregado de 200 µl de buffer de stop (50 mM de HEPES, 10 mM de EDTA y 10 mM de EGTA, pH 5,5) y se enfriaron los tubos por 5 minutos. Luego se agregaron 600 µl de resina Dowex AG 50 WX-8 (forma sódica) resuspendida en buffer para remover el exceso de arginina. Las muestras se mantuvieron a 4ºC por 5 min con agitación esporádica, se centrifugaron a 10.000 xg por 5 min y se determinó la radioactividad del sobrenadante. La conversión inespecífica de L-[^{3}H]-arginina a L-[^{3}H]-citrulina se determinó agregando buffer en lugar de homogenato de tejido. Para estudiar el efecto de la melatonina sobre la actividad de NOS, las retinas se incubaron durante 30 min a 37°C en buffer HEPES-Tris en presencia o ausencia de distintas concentraciones del metoxiindol.

4.2. Determinación de los niveles de NOS-1 (nNOS), NOS-2 (iNOS) y NOS-3 (eNOS)

4.2.1 Preparación de las muestras

Las retinas se homogeneizaron en 150 µl de buffer conteniendo 20 mM de Tris-HCl (pH 7,4), 250 mM de NaCl, 1 mM de EDTA, 1 mM de EGTA, 1 % de Triton, 10 µg/ml de leupeptina, 1 mM de PMSF, 2 µg/ml de pepstatina A. Se tomó una alícuota para determinar la concentración de proteínas. El resto de la muestra se utilizó para determinar los niveles de las diferentes isoformas de NOS por Western blot.

4.2.2. Western blot

Las proteínas del homogenato (80 µg de proteínas/calle) se separaron por SDS-PAGE en un gel al 12%. Luego de la electroforesis se transfirieron a membranas de difluoruro de polivinilideno durante 45 min a 15 V en un sistema Bio-Rad Trans-Blot SD (Laboratorio Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Luego de la transferencia, las membranas se trataron con solución de bloqueo por una hora (5 % de leche en polvo descremada en TBS Tween al 0,1 %, TBS: 0,15 M de NaCl, 50 mM de Tris-HCl, pH 7,4). Posteriormente se incubaron durante 1 h a 4ºC con anticuerpos

específicos (1:1.000) para las distintas isoformas de NOS (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Las membranas se lavaron varias veces con TTBS (TBS 1x con triton 0,5%). Finalmente, se incubaron con un anticuerpo policlonal secundario (3:10.000) conjugado con peroxidasa (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) durante 2 h a temperatura ambiente. La presencia de una determinada isoforma se reveló por quimioluminiscencia (ECL Western Blotting Analysis System, Amersham Pharmacia, Inglaterra) y se determinaron los niveles de β-actina como control interno de carga. Las membranas se escanearon y la intensidad de las bandas se determinó utilizando el programa ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, USA). Los valores se expresaron como unidades arbitrarias de los niveles de NOS-1, NOS-2 o NOS-3/niveles de β-actina.

4.3. Determinación de los niveles de ARNm para transportadores de L-arginina

Se aisló el ARN total de retinas de ratas con el reactivo de TRIzol® (Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Posteriormente se suspendió en agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) y se conservó a -20ºC. Se homogenizaron 2 retinas en 1 ml de TRIzol® y el experimento se repitió 3 veces con diferentes grupos de animales. El ARN obtenido fue tratado con ADNasa I (Deoxyribonuclease I Amplification Grade, Life Technologies, Gaithersburg, MD, U.S.A) para eliminar la contaminación con ADN. Luego, la transcripción reversa (RT) se realizó sobre el total del ARN (2 μg). La síntesis de ADNc se realizó utilizando 200 U de transcriptasa reversa del virus de leucemia murino (M-MLV RT, Promega, WI, USA), 100 ng/μl de random primers (Promega, WI, U.S.A), 0,5 mM de cada dNTPs y 25 U del inhibidor de ribonucleasa rARNsin® en un volumen total de 25 μl. La incubación se realizó durante 50 min a 37ºC y luego se calentó a 70ºC durante 15 min para su terminación. Las reacciones de PCR se realizaron en un ciclador témico Biometra. Se utilizaron 5 μl del ADNc obtenido en la transcripción reversa para la

amplificación de los genes cat. El ADNc se agregó a una mezcla de 20 μl que contenía: 1 X del buffer para PCR, 2,5 mM de $MgCl_2$, 200 μM de dNTP`s, 400 nM de los primers específicos para cada oligonucleótido y 1,25 unidades de Taq ADN polimerasa (PE Applied Biosystems). El diseño de los primers se basó en secuencias publicadas para los ARNm de cat-1, cat-2 y cat-3 murinos (GeneBank NM_007513.1 y L03290). Las secuencias de los primers y el tamaño esperado de los productos de amplificación fue el siguiente: 1) cat-1: 5'-GCCATCGTCATCTCCTTCCTG-3' y 5'-CCCTCCCTCACCGTATTTCAC-3', (530bp); 2) cat-2: 5'-AACGTGCTTTTATGCCTTTGT-3' y 5'-GGTGACCTGGGACTCGCTCTT-3', (612 bp); 3) cat-3: 5'-GCCTTTTGGGCT CTATGTTTC-3', y 5'-TGCGGTTCTGTGGTTGTCT-3' (560 bp), y 4) gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH): 5'-TCCCTCAAGATTGTCAGCAA -3'; y 5'- AGATCCACAACGGATACATT-3' (309 bp). Se estableció previamente el rango apropiado de amplificación para cada par de primers de modo de trabajar en un rango lineal. Las PCRs comenzaron con una primera etapa de desnaturalización a 94ºC por 2 min y luego 27 ciclos de desnaturalización a 94ºC por 45 s, annealing a 55ºC por 30 s, y elongación a 72ºC por 1 min. Por último, las muestras se incubaron a 72ºC por 10 min. Se realizó una corrida electroforética de los productos de la reacción en un gel de agarosa al 1,5 % con un buffer TAE 1X (40 mM Tris-Acetato, 2 mM EDTA; pH 8) que luego fue teñido con bromuro de etidio, fotografiado y cuantificado por análisis densitométrico (Gel Pro Imagen, Image Processing Solutions, North Reading, MA).

4.4. Determinación del influjo de L-^{3}H-arginina

Para el estudio del influjo de L-^{3}H arginina se utilizaron fracciones sinaptosomales crudas de retinas de rata, obtenidas como se describió previamente (Moreno y col., 2005b). Las retinas se homogeneizaron (1:9 p/v) en sacarosa 0,32 M que contenía 1 mM de $MgCl_2$ y se centrifugaron a 900 xg durante 10 min a 4°C. El sobrenadante se centrifugó nuevamente a 30.000 xg por 20 min

y el pellet resultante se resuspendió inmediatamente en buffer HEPES-Tris: HEPES 10 mM, glucosa 10 mM, NaCl 140 mM, KCl 5 mM, $CaCl_2$ 2,5 mM, $MgCl_2$ 1 mM (ajustado a pH 7,4 con Tris-base). Alícuotas de la fracciones sinaptosomales (100-300 μg de proteína/100 μl) se mezclaron con 100 μl de L-^{3}H-arginina (10 μM, 800.000-1.000.000 dpm/tubo, actividad específica: 53,4 Ci/mmol). Luego de 10 min de incubación a 37°C con agitación suave, la reacción se detuvo por el agregado de 4 ml de buffer HEPES-Tris frío. La mezcla fue inmediatamente filtrada bajo vacío sobre filtros Whatman GF/B. Los filtros se lavaron dos veces con 4 ml de buffer frío. La radioactividad retenida en los filtros se determinó en un contador de centelleo líquido. La captación inespecífica se determinó en presencia de un exceso de L-arginina (10 mM).

4.5. Determinación de la acumulación de GMPc

Los niveles de GMPc se cuantificaron por radioinmunoanálisis (RIA). Para ello, los tejidos se homogeneizaron y se incubaron durante 30 minutos a 37°C en buffer Tris-HCl y en presencia de 0,5 mM de 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX). Las suspensiones celulares se centrifugaron a 800 xg durante 5 min, se resuspendió el pellet en 400 μl de agua y se hirvió durante 2 min. Luego, se centrifugaron a 5000 xg por 5 min a 4°C. Los sobrenadantes se purificaron por cromatografía sucesiva en alúmina (AG 7, 100-200) y Dowex 50W-X 8 (forma protonada) para la extracción de GMPc. Para el RIA, alícuotas de la fracción purificada y concentraciones variables de GMPc se acetilaron con anhídrido acético/trietilamina. Luego, se mezclaron con ^{125}I-GMPc (15.000-20.000 dpm, actividad específica 150 mCi/mmol) y un anticuerpo anti-GMPc (Chemicon International Inc., dilución 1:150). Luego de una incubación durante toda la noche, el complejo antígeno-anticuerpo se precipitó con 2 ml de etanol a 4°C y 50 μl de albúmina sérica bovina al 2%; las muestras se centrifugaron a 2000 xg por 30 min y el precipitado se separó del

sobrenadante por aspiración. La radioactividad se determinó en un contador gamma. El rango de la curva estándar fue de 10-5000 fmol de GMPc.

5. Evaluación de la actividad del ciclo glutamato/glutamina retiniano

5.1. Determinación del influjo de L -^{3}H-glutamato

El influjo de estos aminoácidos se determinó en fracciones sinaptosomales de retinas de rata, en forma análoga a la descripta para el influjo de L-arginina. Para ello, alícuotas de las fracciones sinaptosomales retinianas crudas (100-300 μg de proteína/100 μl) se mezclaron con 100 μl de L-^{3}H-glutamato (500.000-800.000 dpm/tubo, actividad específica 17,25). Luego de 10 min de incubación a 37°C con agitación suave, la reacción se detuvo como ya se describió. La captación inespecífica se determinó en presencia de un exceso de L-glutamato (10 mM). Para analizar el efecto de la melatonina sobre el influjo de glutamato, las retinas se incubaron durante 30 min a 37°C en buffer HEPES-Tris en presencia o ausencia de distintas concentraciones del metoxiindol.

5.2. Determinación de la actividad de glutamina sintetasa

Las retinas se homogenizaron en forma individual en 400 μl de buffer fosfato de sodio 10 mM, pH 7,2. Alícuotas de 150 μl del homogenato se mezclaron con 150 μl de una solución conteniendo buffer imidazol 100 mM, 40 mM de $MgCl_2$, 50 mM de 2-mercaptoetanol, 200 mM de hidroxilamina, 20 mM de ATP y 100 mM de glutamato, ajustado a pH 7,2. Luego de una incubación a 37°C durante 15 min, la reacción se detuvo por el agregado de 600 μl de una solución 0,37 M de $FeCl_3$, conteniendo 0,67 M de HCl y 0,20 M de ácido tricloroacético. El precipitado se removió por centrifugación, y la absorbancia del sobrenadante se determinó a 535 nm. El blanco de la reacción se evaluó reemplazando el tejido por buffer. Bajo estas condiciones, 1 μmol de γ-glutamilhidroxamato da una absorbancia de 0,340. La actividad específica de

glutamina sintetasa se expresó como μmoles de γ-glutamilhidroxamato por hora por mg de proteínas. Para estudiar el efecto de la melatonina sobre la actividad de la glutamina sintetasa, las retinas se incubaron durante 30 min a 37°C en buffer HEPES-Tris en presencia o ausencia de distintas concentraciones del metoxiindol.

5.3. Actividad de glutaminasa

La actividad de glutaminasa se determinó a través de la conversión de L-^{3}H-glutamina en L-^{3}H-glutamato, según el método descripto (Kvamme y col., 1985). Cada retina se homogenizó en 40 μl de 0,1% Triton X-100 en 7,5 mM de Tris-HCl, pH 8,8. La mezcla de reacción contenía 20 μl de homogenato (200- 400 μg de proteínas), 20 mM de glutamina, L-^{3}H-glutamina (0,2- 0,5 μCi) y buffer fosfato de potasio 45 mM, pH 8,2, en un volumen total de 100 μl. Las muestras se incubaron con agitación durante 1 h a 30°C. La reacción se frenó por el agregado de 1 ml de una solución 20 mM de imidazol frío, pH 7,0. Luego de una breve centrifugación, los sobrenadantes se sembraron en una resina de intercambio aniónico de 0,6 x 3,5 cm (Dowex, AG1-X2, 200-400, Laboratorios Bio-Rad) previamente cargada con 1ml de HCl 1 M y lavada con agua. El sustrato de la reacción se removió por el agregado de 6 ml de imidazol 20 mM, que se descartó y el producto final se eluyó mediante el lavado de la resina con 3 ml de HCl 0,1 M. Alícuotas de esta fracción se mezclaron con líquido centellante y se determinó la radioactividad. El blanco de la reacción se determinó reemplazando el homogenato de tejido por buffer. La actividad específica de glutaminasa se expresó como μmoles de glutamato por hora por mg de proteínas. Para estudiar el efecto de la melatonina sobre la actividad de la glutaminasa, las retinas se incubaron durante 30 min a 37°C en buffer HEPES-Tris en presencia o ausencia de distintas concentraciones del metoxiindol.

6. Inyecciones intravítreas de melatonina.

Se utilizó una aguja 30-G montada en una jeringa Hamilton de 10 µl. En animales anestesiados, se enfocaron los ojos bajo un microscopio binocular Colden con luz coaxial. La aguja se introdujo a través de la pars plana en un ángulo tal que no se dañara ni la retina ni el cristalino hasta poder visualizarla bajo una lente directa. Ya en la cavidad vítrea, se inyectó un volumen de 2 µl en un intervalo de 30 s. Se utilizó anestesia tópica antes de realizar las inyecciones. Para estimar la concentración final de melatonina (10 ó 100 nM) se consideró un volumen total de vítreo de 60 ± 2µl (Sumioka y col., 2000). Se excluyeron los animales que desarrollaron cataratas o sangrado intraocular como resultado de la inyección intravítrea.

7. Determinación de la actividad del sistema GABAérgico retiniano

7.1. Determinación del turnover de GABA

Se determinó por acumulación del aminoácido luego de la inhibición de la enzima que cataliza la degradación de GABA (GABA transaminasa) (Bertilsson y col., 1977). Para prevenir el aumento post-mortem en el contenido de GABA se administró ácido 3-mercaptopropiónico, un inhibidor de la enzima que cataliza la síntesis de GABA (GAD), 2,5 min antes del sacrificio, en una dosis de 50 mg/kg (i. p.) (Van der Heyden y col., 1978). La presunción central de este método es que luego de la administración de γ-vinil-GABA, la acumulación de GABA es lineal por al menos 1 h. Los animales se inyectaron con γ-vinil-GABA 62,5 min antes del sacrificio a una dosis de 0,9 g/kg. Luego del sacrificio se extrajeron las retinas, se homogeneizaron en forma individual en agua destilada, se centrifugaron a 12.000 xg por 15 min y se descartó el precipitado. Para determinar el contenido de GABA acumulado, se utilizó el ensayo de radiorreceptor (Bernasconi y col., 1980). Para ello, alícuotas de 100 µl de una preparación cruda de membranas sinápticas de cerebelo de rata (400 µg de proteínas) en buffer 50 mM de Tris-citrato, pH 7,2, se incubaron con 300 µl de la muestra o varias concentraciones de GABA y 100 µl de ^{3}H-muscimol (actividad

específica: 10 Ci/mmol) disuelto en agua destilada en una concentración final de 5 nM. Las muestras se incubaron durante 10 minutos a 22°C y se centrifugaron a 12.000 xg por 10 min a 4°C. El precipitado resultante se lavó superficialmente tres veces con buffer Tris-citrato. La radioactividad se extrajo con hidróxido de hiamina. La unión inespecífica se determinó en incubaciones paralelas en presencia de 200 µM de GABA. El rango de detección para GABA fue de 2,5-100 pmol. A fin de verificar que el desplazamiento del ^{3}H-muscimol de sus sitios de unión se deba a GABA, una serie paralela de muestras de tejido se incubaron en presencia del sistema enzimático de degradación del GABA altamente específico, GABAsa, antes del ensayo. Tanto el GABA estándar como el endógeno del tejido fue completamente degradado por la GABAsa (más del 85%).

7.2. Determinación de la actividad de glutámico descarboxilasa (GAD)

Las retinas se homogeneizaron en forma individual en 0,05 M de buffer fosfato, 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 especifica: 49,6 Ci/mmol, 0,2 µCi/ml), 200 µM de fosfato de piridoxal, y 10 mM de β-mercaptoetanol. Las incubaciones se realizaron por triplicado. La reacción se finalizó por agregado de ácido tricloroacético (TCA) al 10% y el $^{14}CO_2$ 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 agregó antes que el homogenato de tejido.

8. Determinación de la actividad del sistema de defensa antioxidante endógeno

8.1. Actividad de superóxido dismutasa (SOD)

La actividad de SOD se evaluó a través de la capacidad de la muestra de inhibir la autooxidación espontánea de una solución de 10 mM de adrenalina en buffer glicina 50 mM (pH 10,2) a 37°C. Se determinó la absorbancia a 480 nm para diferentes cantidades de homogenato de retinas en buffer fosfato 50 mM, en presencia de la solución de adrenalina. Los cambios de absorbancia se determinaron durante 2 min a intervalos de 5 segundos. A partir de los resultados se graficó el logaritmo del cociente entre la velocidad de oxidación de adrenalina en presencia de la muestra y de la solución de adrenalina sola (oxidación espontánea), en función de la cantidad de muestra. Las UI de SOD se definieron como la dilución de muestra necesaria para producir el 50% de inhibición de oxidación de adrenalina a pH alcalino. Para estudiar el efecto de la melatonina sobre la actividad de SOD, las retinas se incubaron en presencia o ausencia de distintas concentraciones del metoxiindol durante 30 min a 37°C en buffer HEPES-Tris.

8.2. Determinación de los niveles de glutatión reducido (GSH)

Los niveles de glutatión reducido (GSH) se evaluaron de acuerdo al método descripto por Beutler y col. (1963). Las retinas se homogeneizaron en buffer fosfato de potasio 50 mM, pH 7,4. Muestras de 100 μl de homogenato se mezclaron con 25 μl de TCA al 50% y 1 mM de EDTA. Luego de una incubación de 5 min en hielo, las muestras se centrifugaron a 13.200 xg durante 2 min. El sobrenadante resultante se mezcló con 800 μl de ácido 5,5 ditio-bis (2-nitrobenzoico) (DTNB) 0,25 mg/ml en buffer fosfato de potasio 0,5 M, pH 7,4. Se determinó la absorbancia espectrofotométricamente a 410 nm. El rango de la curva estándar de GSH fue de 0,50-50 nmol. Para estudiar el efecto de la melatonina sobre los niveles de GSH, las retinas se incubaron en presencia o ausencia de distintas concentraciones del metoxiindol durante 30 min a 37°C en buffer HEPES-Tris

8.3. Determinación de la peroxidación lipídica

La peroxidación lipídica se cuantificó a través de la determinación de los niveles de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS). Se homogeneizaron las retinas en buffer fosfato de potasio 15 mM, conteniendo 60 mM de KCl, pH 7,4. Luego, el homogenato (300 μl) se mezcló con 75 μl de SDS 10% y 1,4 ml de ácido tiobarbitúrico al 0,8 % disuelto en buffer acetato, pH 3,5. Las muestras se incubaron a 100ºC durante 1 h y luego de enfriarlas, se determinó la absorbancia a 515 nm de excitación y 553 nm de emisión con un espectrofotómetro de fluorescencia Jasco FP770 (Japan Spectroscopic Co. Ltd., Japón). Los niveles de TBARS se determinaron a partir de una curva estándar de malondialdehído bis-dimetil acetal (MDA) en el rango de 10-2000 pmol. Los resultados se expresaron como nmoles de MDA/mg de proteína. Para analizar el efecto de la melatonina sobre este parámetro, las retinas se incubaron en presencia o ausencia de distintas concentraciones del metoxiindol durante 30 min a 37°C en buffer HEPES-Tris.

8.4. Actividad de catalasa

La actividad de la catalasa se evaluó de acuerdo al método descripto por Aebi. (1982), Las retinas se homogeneizaron en buffer fosfato 50 mM (pH 7,4). Las muestras de 200 μL de homogenato se mezclaron con 25 μl de TritonX-100 20%. Luego de una incubación de 5 min a 4ºC, los homogenatos se centrifugaron durante 1 min a 10.000 xg. Alícuotas del sobrenadante se mezclaron con 900 μl de buffer fosfato 50 mM. La reacción empezó con el agregado de 50 μl de H_2O_2 12 mM y se determinó la absorbancia a 240 nm, cada 10 s durante 100 s. La actividad enzimática se calculó usando el coeficiente de extinción del H_2O_2 a 240 nm y los resultados fueron expresados como nmol de H_2O_2/min. mg proteínas. Para analizar el efecto de la

melatonina sobre la actividad de catalasa, las retinas se incubaron en presencia o ausencia de distintas concentraciones del metoxiindol durante 30 min a 37°C.

8.5. Determinación del contenido de melatonina

Las retinas se homogeneizaron en 2 ml de HCI 0,1 M. La melatonina se extrajo mediante la adición de 5 ml de diclorometano. Los tubos se agitaron dos veces durante 20 s y se centrifugaron a 900 xg durante 3 min. La fase acuosa se descartó y se agregaron 2 ml de $NaHCO_3$ al 2 % sobre la fase orgánica, procediendo en forma análoga. Se aspiró la solución de bicarbonato y se lavó la fase orgánica con 2 ml de agua destilada, se repitió el procedimiento y, por último, se aspiró completamente la fase acuosa y la grasa emulsionada. Se tomaron alícuotas de 2 ml de la fase orgánica de cada muestra, se llevaron a sequedad bajo vacío y se conservaron a -20º C hasta la realización del RIA. La recuperación del procedimiento de extracción fue de 76 ± 5%. Las muestras se resuspendieron en buffer (3 mM de NaN_3, 0,05 M de KH_2PO_4 y l mg/ml de gelatina, llevado a pH 7,0 con KOH). Se agregó ^{3}H-melatonina (20.000-24.000 dpm; actividad específica 38,8 Ci/mmol) y un antisuero de conejo anti-melatonina (dilución final 1:1600) gentilmente cedido por el Dr. Takashi Matozaki (Laboratory of Biosignal Sciences, Institute for Molecular and Cellular Regulation, Gunma University, Japón). Los tubos se incubaron durante 2 h a 37ºC. Finalizada la incubación, se agregó una mezcla de carbón-dextrano, se agitaron las muestras, se incubaron a 4ºC durante 40 min y se centrifugaron a 15.000 rpm durante 10 min a 4ºC. Se determinó la radioactividad en una alícuota del sobrenadante. El contenido de melatonina se determinó a partir de una curva estándar de melatonina, con un rango de 20 a 5.000 pg/tubo. Los coeficientes de variación intra- e inter-ensayo fueron 4,5 y 8,5 %, respectivamente.

9. Implantación subcutánea de un pellet de melatonina

En animales anestesiados, se realizó una incisión en el dorso a la altura del cuello del animal. Se divulsionó el plano de tejido celular subcutáneo, donde se colocó un pellet de melatonina de 20 mg en 3% (m/v) de aceite vegetal, comprimido en un cilindro de 2,5 mm de diámetro y 1 mm de longitud. La incisión se cerró con lino 5-0. Este procedimiento se realizó cada quince días, comenzando un día antes de la primera inyección de AH o a partir de la 6ta semana de tratamiento con AH y durante el tiempo que duró el experimento (10 semanas). En el grupo control se realizó una cirugía similar sin implantación del comprimido.

10. Estudios electrorretinográficos (ERGs)

Los animales se anestesiaron como ya se describió. Para el registro del ERG, los animales se adaptaron a la oscuridad durante 6 h. Luego, se administró una gota de proparacaína como anestésico tópico y lágrimas artificiales para maximizar la conductibilidad entre el electrodo y la córnea. Se apoyó un electrodo de oro sobre la córnea, como referencia se utilizó un electrodo de tipo aguja localizado en la oreja ipsilateral y el electrodo de tierra se colocó en la porción media de la cola del animal (Figura 14). Los electrodos se colocaron bajo luz roja tenue (1 lux) de 15W de intensidad, que no afectó la adaptación de los animales a la oscuridad y se apagó durante el registro. Los registros se realizaron en forma simultánea en ambos ojos. Se utilizó un fotoestimulador de leds tipo flash de 0,95 log cd.s/m^2 de intensidad, 0,2 Hz de frecuencia a una distancia de 20 cm del animal, en ambiente de total oscuridad. Para la amplificación y el registro de la señal se utilizó un equipo AKONIC BIO-PC (Akonic BIO-PC, Akonic, Argentina). La señal se registró con una ganancia de 100 μV, sin atenuación, con filtros de ruido (50 Hz) y filtros de alta frecuencia (1.000 Hz) y baja frecuencia (1,5 Hz) para optimizar el registro. Se aplicaron 10 estímulos por estudio y se tomó el promedio de los registros. Se determinaron las amplitudes y latencias de las ondas a y b para cada ojo. La onda a se determinó desde la línea

isoeléctrica hasta la primera deflexión y la onda b, desde esta deflexión hasta el pico de la onda b.

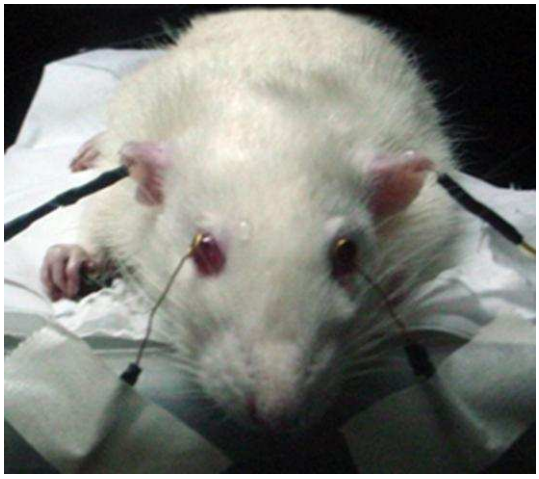

Figura 14. Disposición de electrodos para el registro de ERG.

11. Potenciales visuales evocados (VEPs)

Para el registro de los VEPs se colocaron quirúrgicamente dos electrodos de acero inoxidable 4 mm lateral a la cisura inter-hemisférica y 5,6 mm por detrás de bregma (electrodo activo). Se colocaron electrodos de referencia en posición 2 mm lateral a la línea media y 2 mm antes de bregma, y un electrodo de tierra en la cola. Ambos electrodos se aislaron y fijaron con acrílico dental y la piel se suturó con nylon 5/0. Los VEPs se evaluaron 5 días después de la implantación de los electrodos de la siguiente manera: después de 6 h de adaptación a la oscuridad, las ratas se anestesiaron, las pupilas se dilataron y la córnea se irrigó de forma intermitente como se describió anteriormente, bajo luz roja tenue. Todos los registros se realizaron dentro de los 20 min desde la inyección de anestésicos y los animales se mantuvieron a temperatura constante durante y después del procedimiento mediante mantas calefactoras. Cada ojo se registró individualmente, se ocluyó el ojo contralateral, y se registró un promedio de 70 estímulos. Los ojos se estimularon con luz blanca sin atenuar (1 Hz) con un estimulador fótico (diodos emisores de luz), fijado a la máxima intensidad de luz y los registros se amplificaron, filtraron (0,5 Hz filtro de baja frecuencia, 100 Hz filtro de alta frecuencia) y promediaron. Se evaluó la amplitud

entre la deflexión N2 y el pico P2, y se determinó la latencia de N2 desde el inicio hasta el segundo pico negativo.

12. Inducción de tolerancia isquémica

Se aplicaron pulsos breves (5 min) de isquemia en un ojo de los animales inyectados de forma bilateral con vehículo o CS, mientras que el ojo contralateral fue canulado sin elevar la PIO (procedimiento simulado). La selección de los ojos que recibieron pulsos de isquemia o tratamiento simulado se realizó al azar. Los animales se anestesiaron como ya se describió. Luego de la aplicacion tópica de propacaína, la cámara anterior se canuló con una aguja de calibre 30-G conectada a una botella presurizada, conteniendo solución salina estéril. La isquemia retiniana fue inducida a través del aumento de la PIO a 120 mmHg durante 5 min, de acuerdo al método descripto previamente (Fernandez y col., 2009). Mediante esta maniobra se logra una isquemia ocular completa, caracterizada por la pérdida de la onda b del ERG y el cese del flujo en los vasos retinianos, determinado por la observación del fondo de ojo. Los pulsos breves de isquemia retiniana se aplicaron en forma semanal comenzando a la 6ta semana de hipertensión ocular y continuando hasta la 10ma semana. Durante y después de este procedimiento, los animales se mantuvieron normotérmicos mediante mantas calefactoras. Cada pulso de isquemia se aplicó cuatro días después de la inyección de vehículo o CS. Los animales fueron divididos en 4 grupos experimentales, como se muestra en la Figura 15.

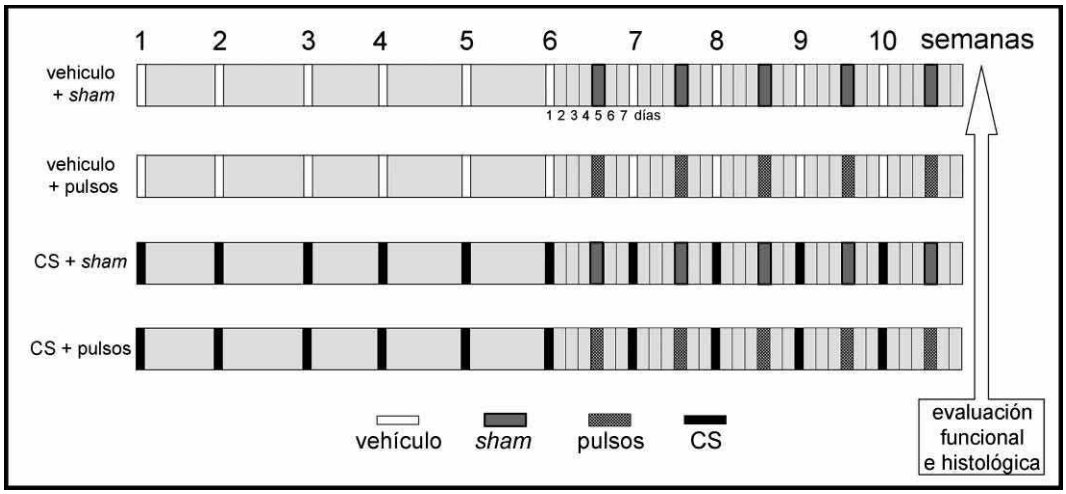

Figura 15. Representación esquemática de los grupos experimentales utilizados para el estudio del efecto de la tolerancia isquémica sobre el daño inducido por glaucoma experimental. Los pulsos breves de isquemia o el procedimiento simulado (sham) se aplicaron 4 días después de la inyección semanal de vehículo o CS, comenzando en la 6ta semana de tratamiento.

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

13.1. Estudio histopatológico

Los ojos se enuclearon luego de una sobredosis de anestesia. Inmediatamente se fijaron por inmersión en paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 1% en buffer fosfato (pH 7,2) por 1 h. 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 1,5 mm posterior al globo ocular, que luego se fijó en tetróxido de osmio en buffer fosfato. Los nervios se procesaron en resina epoxi y cortes de 1 μm se tiñeron con azul de toluidina. Los segmentos oculares posteriores se deshidrataron en series de alcohol y se embebieron en parafina. Se realizaron cortes de 4 μm a lo largo del meridiano horizontal por la cabeza del nervio óptico y se tiñeron con hematoxilina-eosina.

13.2. Procesado de imágenes

Las imágenes de microscopía óptica se capturaron digitalmente con una cámara Sony SSCDC50 adaptada a un microscopio Nikon Eclipse E4000 (iluminación: 6-V luz halógena, 20W). Las

imágenes capturadas digitalizadas se transfirieron al sistema de análisis de imagen Scion Image (Scion Corporation Beta 4.0.2, Windows). La morfometría retiniana se evaluó según lo descrito por Takahata y col. (2003), con modificaciones menores. Se seleccionaron tres secciones de cada retina al azar. Se analizaron nueve imágenes microscópicas de 1 mm desde el borde temporal del nervio óptico en forma digital. Se utilizó un objetivo de 40 x con luz acromática. Se determinó el espesor (en μm) de la capa plexiforme interna (CPI), la capa nuclear interna (CNI), la capa nuclear externa (CNE) y la retina total. El número de células en la capa de células ganglionares (CCG) se expresó en células por 100 μm. Para cada ojo, se promediaron los resultados obtenidos en tres secciones diferentes y se registró la media de 5 ojos como el valor representativo de cada grupo. El análisis morfométrico se realizó por observadores que desconocían el protocolo utilizado en cada ojo.

14. Inmunomarcación de Neu-N, Thy-1 y Brn3a

La recuperación antigénica se realizó por calentamiento (a 90°C) durante 30 min en secciones sin teñir inmersas en buffer citrato (pH 6,3) que fueron preincubadas con suero normal de caballo al 2% durante 1 h. Las secciones se incubaron durante toda la noche a 4°C con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-NeuN (1:120; Millipore), un anticuerpo anti-Thy-1 (1:1.000; Millipore) o un anticuerpo anti-Brn3a (1:500; Millipore). Luego, se agregó un anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con Alexa Fluor 568 (1:500; Molecular Probes). Después de la inmunomarcación, las secciones se montaron con medio Antifade con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Vector Laboratories). Algunas secciones fueron tratadas sin los anticuerpos primarios para confirmar la especificidad. Además, la inmunorreactividad para Thy-1 (1:500; Millipore) se desarrolló con estreptavidina-biotina marcada, utilizando el sistema LSAB2®, de acuerdo a las instrucciones del fabricante (LSAB2® System HRP Dakocytomation, Dako, Carpinteria, CA, USA). Se utilizó un microscopio Olympus BX50 (Olympus, Tokio, Japón). Se

tomaron imágenes digitales de diferentes muestras usando el mismo tiempo de exposición, brillo y contraste.

15. Determinación de apoptosis

La determinación de apoptosis se realizó usando el método de TUNEL (deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling). Para ello, se utilizó un kit de ApopTag® Fluorecein In Situ Apoptosis Detection (S7110, Chemicon, CA, USA), de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Para cada sección de retina, se calculó el número total de células $TUNEL^+$ a lo largo de toda la retina. Para cada ojo, los resultados obtenidos a partir de cuatro secciones separadas se promediaron y la media de cinco ojos se registró como el valor representativo de cada grupo experimental.

16. Morfometría del nervio óptico

El conteo de los axones del nervio óptico se realizó según lo descrito previamente (Levkovitch-Verbin y col., 2002), con modificaciones menores. Se capturaron 5 imágenes separadas de distintas regiones del nervio óptico con un objetivo acromático de 100 x, para determinar la densidad y distribución de los diámetros de los axones. Las imágenes fueron convertidas a escala de grises de 8 bits y por un examen visual se determinó un valor umbral medido en forma manual que se aplicó constantemente. Por último, las imágenes se convirtieron en forma binaria. Las fibras mielinizadas se delinearon digitalmente por el margen exterior de sus vainas de mielina y se midió el área total de los axones. El número de axones contados en 5 imágenes representó aproximadamente el 10 % del área total del nervio óptico. El análisis morfométrico se realizó por operadores que desconocían el protocolo utilizado en cada ojo.

17. Neurotomía óptica radial (NOR)

Las ratas se anestesiaron en forma sistémica y local como ya se describió. Los animales fueron sometidos a una neurotomía óptica radial (NOR) en un ojo, mientras que el ojo contralateral fue sometido a un procedimiento simulado. La NOR se realizó de la siguiente manera: los ojos se centraron bajo un microscopio binocular Colden quirúrgico con luz coaxial para la visualización del fondo de ojo e iluminación. Se realizó una punción escleral a 1 mm del limbo esclerocorneal, utilizando una aguja 30-G dental. Se procedió a una incisión en el borde del anillo neuro-retinal, en el hemisferio nasal del disco óptico, cortando una parte igual del nervio óptico y retina peripapilar, evitando dañar los vasos centrales de la retina. Se tuvo el cuidado de realizar la incisión en forma radial al disco óptico y paralela al patrón de las fibras nerviosas. Los ojos con operación simulada se sometieron a un procedimiento similar (punción escleral a 1 mm del limbo esclerocorneal), pero sin ninguna incisión.

18. Evaluación histológica de la NOR

Las ratas se sacrificaron a diferentes intervalos post-cirugía y los ojos fueron inmediatamente enucleados, incluyendo no menos de 3 mm del nervio óptico adjunto. Los ojos se fijaron por inmersión en paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 1% en buffer fosfato (pH 7,2) por 1 h y se incluyeron en parafina. Los ojos se cortaron en secciones a través del meridiano ecuatorial. La calota posterior incluyendo el disco óptico y el nervio fueron cortados en serie, cada 5 μm desde la superficie interior del disco óptico hacia el segmento retrobulbar del nervio. Las imágenes de microscopía óptica se capturaron digitalmente con una cámara Nikon Coolpix S10 adaptada a un microscopio Nikon Eclipse E4000 (iluminación: 6-V luz halógena, 20W). Las secciones se tiñeron con hematoxilina y eosina y fueron analizadas por observadores que desconocían el protocolo utilizado en cada ojo. El examen microscópico de los cortes teñidos con hematoxilina

y eosina se utilizó para evaluar la incisión escleral y para determinar la presencia de daño en la vasculatura del nervio óptico.

19. Evaluación del reflejo pupilar (RP)

Los animales se adaptaron a la oscuridad por 1 h antes de la evaluación del RP. Se aplicó un pulso de luz blanca (1.200 lux) en un ojo y se registró la contracción de la pupila en el ojo contralateral (reflejo pupilar consensual). Los registros se realizaron bajo luz infrarroja con una cámara de video digital (Sony DCR-SR60, Japón). Se determinó el diámetro de la pupila antes y 30 s después de aplicar el pulso de luz. La velocidad de muestreo fue de 30 imágenes/s. Se adquirieron las imágenes a partir de la grabación de un video digital utilizando el programa OSS Video Decompiler Software (One Stop Soft, New England, USA). El porcentaje de contracción de la pupila se calculó como el porcentaje del área de la pupila a los 30 s del inicio del pulso (estado estacionario) en relación con el tamaño de la pupila dilatada. En una serie de experimentos, se estimuló el ojo con operación simulada o NOR y el RP se registró en el ojo contralateral intacto. En otra serie de experimentos, el estímulo se aplicó en el ojo intacto y se registró la contracción de la pupila en el ojo contralateral con operación simulada o NOR.

20. Modelo experimental de glaucoma inducido por la cauterización de las venas epiesclerales

Se realizó la cauterización de las venas epiesclerales en ratas según la técnica descripta por Shareef y col. (1995). Brevemente, las ratas se anestesiaron y se aplicó anestesia tópica como ya se describió. Se realizó una incisión de 2 mm de largo a través de la conjuntiva en la periferia del limbo. A continuación, se realizaron dos cortes radiales en los bordes de la incisión inicial. Exponiendo las venas epiesclerales y usando un cauterizador oftalmológico, se procedió a la cauterización específica y precisa de 3 venas, evitando el daño térmico en el tejido vecino

(Figura 16). El procedimiento simulado se realizó en forma análoga pero evitando la cauterización de las venas epiesclerales. Luego de cada procedimiento se aplicó antibiótico por vía tópica. Todos los tejidos oculares, incluyendo la córnea, el cristalino y la esclera, no presentaron alteraciones durante todo el experimento.

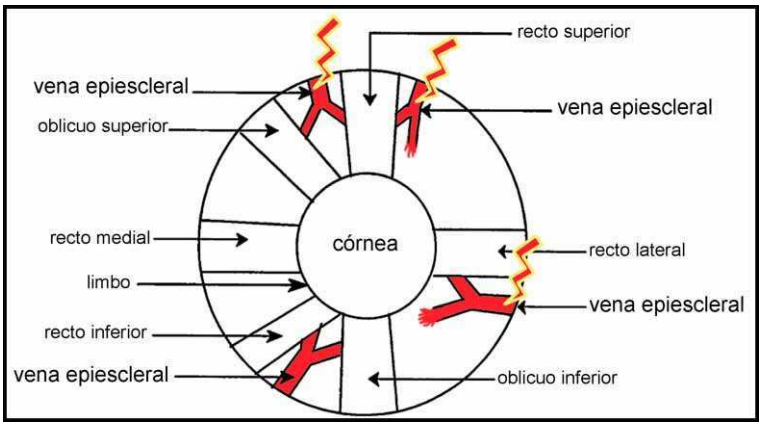

Figura 16: Representación esquemática de la cauterización de las venas epiesclerales. Se cauterizaron 3 de las 4 venas que drenan el humor acuso de la cámara anterior.

21. Determinación del contenido de proteínas

El contenido de proteínas se determinó por el método de Lowry y col. (1951), usando albúmina bovina (BSA) como estándar.

22. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos se utilizaron los tests de Student para la comparación entre dos grupos experimentales o ANOVA seguido de test de Tukey o de Dunnett, para comparaciones múltiples, según se indica en cada caso.

1. Estudio del efecto de la hipertensión ocular sobre la actividad del sistema nitrérgico retiniano

Sobre la base de los antecedentes mencionados en la Introducción, el objetivo de la primera serie de experimentos que se describirán a continuación, fue estudiar la actividad del sistema nitrérgico en un modelo de glaucoma experimental en ratas inducido por la administración semanal de ácido hialurónico (AH) en la cámara anterior del ojo. La presión intraocular (PIO) en los ojos inyectados con AH durante 3 ó 6 semanas fue significativamente mayor que la de los ojos inyectados con vehículo (Tabla I). No se observaron diferencias significativas en la PIO de los ojos inyectados con vehículo entre los intervalos analizados ni entre ojos intactos (no inyectados) e inyectados con solución fisiológica (datos no mostrados).

Tabla I. Valores de PIO en ojos de ratas inyectadas con vehículo o AH durante 3 ó 6 semanas.

	Presión intraocular (mmHg)	
	vehículo	AH
3 semanas	11,8 ± 0,24	23,2 ± 0,41**
6 semanas	12,3 ± 0,18	22,5 ± 0,38**

Se evaluó la PIO con un Tonopen XL en ratas inyectadas con AH en un ojo y vehículo en el ojo contralateral durante 3 ó 6 semanas. En estos intervalos, la inyección de AH indujo un aumento significativo de este parámetro. Se representan las medias ± EE (n = 20 ojos / grupo) **p< 0,01, test de Tukey.

En trabajos previos de nuestro laboratorio se demostró una alteración significativa en la actividad del ciclo glutamato/glutamina, que podría provocar un aumento en las concentraciones sinápticas de glutamato en la retina de ojos inyectados con AH. Dado que uno de los blancos posibles de la sobre-estimulación glutamatérgica es el sistema nitrérgico, se analizó el efecto de la hipertensión ocular crónica sobre la actividad de óxido nítrico sintasa (NOS) a las 3 y 6 semanas de hipertensión ocular. Como se muestra en la Figura 17, la actividad de NOS aumentó significativamente en ambos intervalos de tratamiento con AH con respecto a los ojos inyectados con vehículo, aunque el aumento observado a las 3 semanas fue mayor que el correspondiente a

6 semanas de hipertensión ocular (p< 0,01). Resultados similares se obtuvieron cuando se analizó la actividad de NOS en presencia de valina, un inhibidor de la arginasa. La presencia de valina provocó una disminución leve (~ 10%) pero significativa en la conversión de L-^{3}H-arginina en L-^{3}H-citrulina en todos los grupos experimentales (Figura 17).

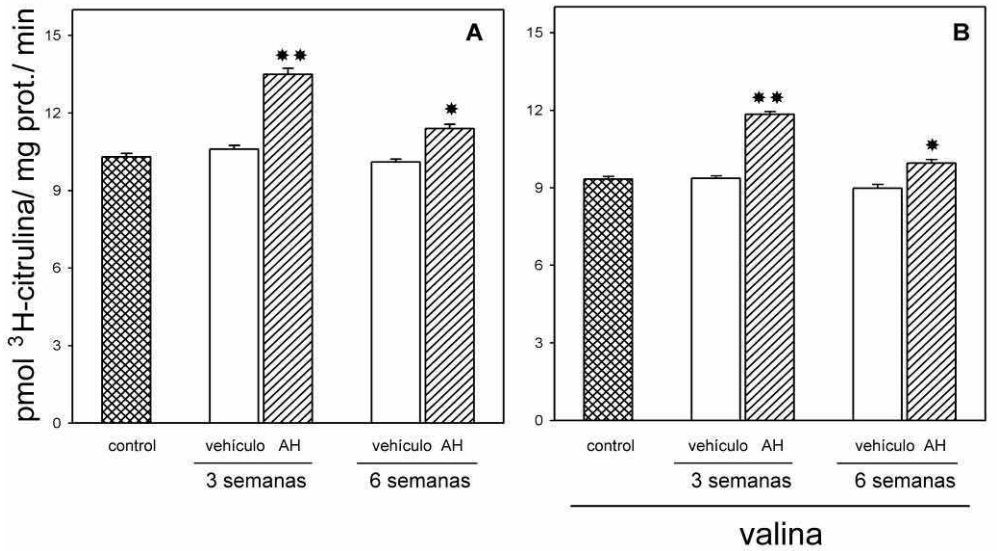

Figura 17. Actividad de NOS en retinas de ojos inyectados con vehículo o AH durante 3 ó 6 semanas. Se evaluó la conversión de ^{3}H-arginina a ^{3}H-citrulina en ausencia (A) o presencia (B) de valina (25 mM). En ambos casos, se observó un aumento significativo de este parámetro en las retinas de ojos inyectados con AH durante 3 ó 6 semanas respecto a los ojos inyectados con vehículo por el mismo período. Tanto en la ausencia o presencia de valina, la conversión de ^{3}H-arginina a ^{3}H-citrulina fue significativamente mayor a las 3 que a las 6 semanas de tratamiento con AH (p< 0,01). No se observaron diferencias en la actividad de NOS entre los animales manipulados y anestesiados una vez por semana durante 6 semanas pero no inyectados (control) y los animales inyectados con vehículo durante el mismo período (vehículo). En todos los grupos experimentales, la valina disminuyó significativamente la conversión de ^{3}H-arginina a ^{3}H-citrulina. Se representan la medias ± EE (Figura 1A, n= 15-16 animales/grupo, Figura 1B, n = 10-12 animales/grupo. *p< 0,05, **p < 0,01 vs. ojos inyectados con vehículo por el mismo período, test de Tukey.

La Figura 18 muestra Western blots representativos del análisis de los niveles proteicos de las isoformas de NOS en retinas de ojos inyectados con vehículo o AH durante 3 semanas, utilizando anticuerpos específicos para nNOS (NOS-1), iNOS (NOS-2) y eNOS (NOS-3). Se identificaron bandas de ~160, ~130 y ~134 kDa en todas las muestras, de acuerdo con la masa

molecular descripta en otros tejidos para NOS-1, NOS-2 y NOS-3, respectivamente. El análisis densitométrico de las bandas demostró que el tratamiento con AH durante 3 semanas no modificó significativamente los niveles retinianos de ninguna de estas isoformas de NOS. A las 6 semanas de tratamiento con AH se obtuvieron resultados similares (datos no mostrados).

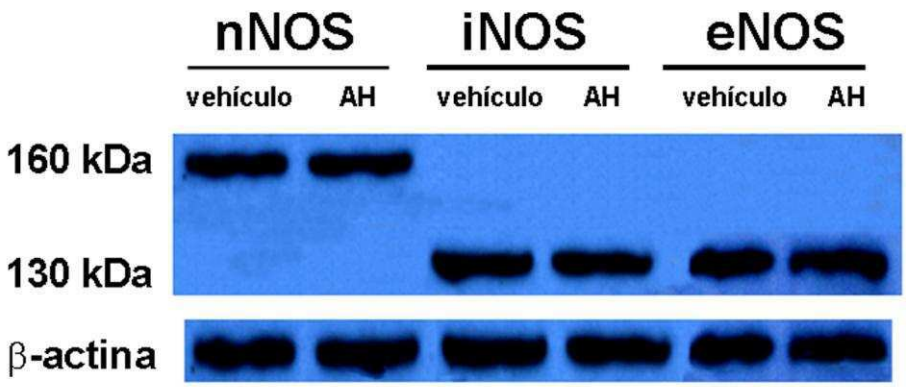

Figura 18. Determinación de los niveles proteicos de NOS-1, NOS-2, y NOS-3 en retinas de ojos inyectados con vehículo o AH durante 3 semanas. Se muestran Western blots representativos. En todas las muestras se identificaron bandas de ~160 kDa, ~130 kDa, y ~134 kDa correspondientes a NOS-1, NOS-2 y NOS-3, respectivamente. De acuerdo al análisis densitométrico (no mostrado), no se observaron diferencias significativas en los niveles de estas isoformas/niveles de ß-actina entre lo ojos tratados con vehículo o AH (n = 5 ojos/grupo).

Además de la actividad de NOS, una etapa limitante en la síntesis de NO es el influjo del sustrato de esta enzima, la L-arginina. Por lo tanto, se analizó este parámetro en ojos inyectados con vehículo o AH durante 3 ó 6 semanas. Como se muestra en la Figura 19, el influjo de L-arginina aumentó significativamente en retinas de ojos inyectados con AH durante ambos períodos, aunque este aumento fue mayor a las 3 que a las 6 semanas de tratamiento ($p < 0,01$).

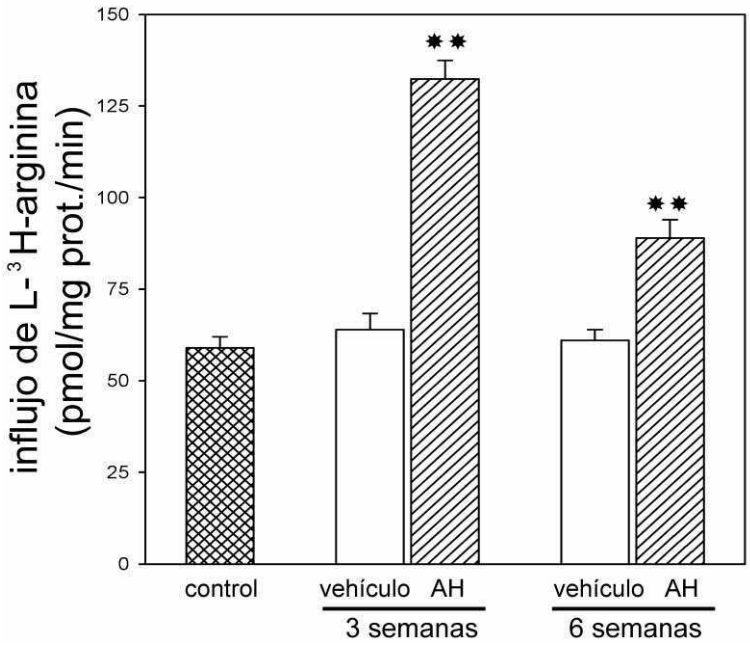

Figura 19. Determinación del influjo de L-arginina en retinas de ojos inyectados con vehículo o AH durante 3 ó 6 semanas. El influjo de L-^{3}H-arginina aumentó significativamente en retinas de ojos con 3 y 6 semanas de hipertensión ocular. El aumento de este parámetro fue significativamente mayor a las 3 que a las 6 semanas de tratamiento con AH ($p< 0,01$). No se observaron diferencias entre ojos no inyectados y los inyectados con vehículo. Se representan las medias ± EE (n = 10 ojos/grupo). **$p< 0,01$ vs. ojos inyectados con vehículo durante el mismo período, test de Tukey.

Con el objeto de determinar los niveles de ARNm que codifican para los transportadores de L-arginina se realizó un análisis por RT-PCR semicuantitativa. En el panel izquierdo de la Figura 20 se muestran geles representativos del análisis de los niveles de ARNms de CAT-1 y CAT-2 (cationic aminoacid transporter tipos 1 y 2, respectivamente). En el panel derecho de esta misma Figura se muestra el análisis cuantitativo de los resultados obtenidos. El tratamiento con AH durante 3 ó 6 semanas indujo un aumento significativo en los niveles de ARNm de estos transportadores. Los niveles de ARNm de CAT-2 fueron significativamente mayores a las 6 que a las 3 semanas de tratamiento con AH ($p< 0,01$), en tanto que para los niveles de ARNm de CAT-1 no se observaron diferencias entre ambos grupos. No se detectaron niveles de ARNm del transportador CAT-3 en ninguno de los grupos experimentales (datos no mostrados).

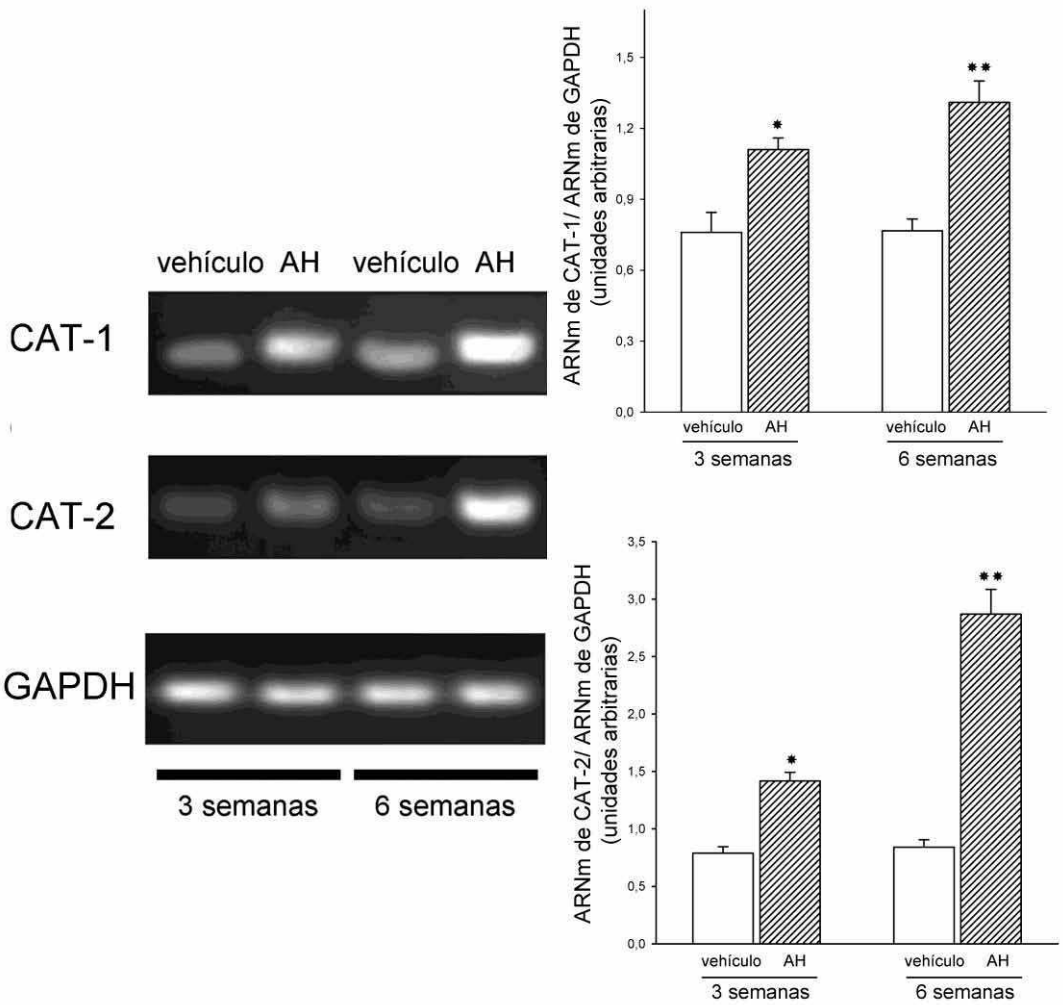

Figura 20. Cuantificación de los niveles de ARNm de los transportadores de arginina de tipo CAT-1 y CAT-2. A las 3 y 6 semanas de hipertensión ocular, los niveles de ARNm de ambos transportadores aumentaron significativamente con respecto al grupo tratando con vehículo. Se representan las medias ± EE de los niveles de ARNm de los transportadores /niveles de ARNm de GAPDH (n = 4 ojos/grupo). En el panel de la izquierda se muestran geles representativos correspondientes al análisis de cada uno de estos transportadores. *p< 0.05, **p< 0,01 vs. ojos inyectados con vehículo por el mismo período, test de Tukey.

Si la hipertensión ocular aumenta la actividad de NOS y el influjo de L-arginina, resultaría esperable que el efecto de la L-arginina fuera mayor en retinas de ojos tratados con AH. Para analizar esta hipótesis, se determinó la acumulación de GMPc (en presencia de IBMX). A las 3 semanas de tratamiento, se observó un aumento significativo en la acumulación de este nucleótido en retinas de ojos inyectados con AH con respecto a ojos inyectados con vehículo,

mientras que a las 6 semanas de no se observaron diferencias significativas entre retina de ojos normotensos e hipertensos (Figura 21).

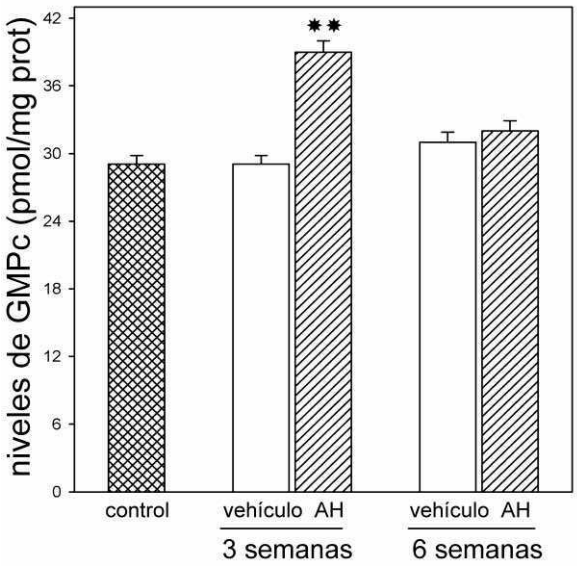

Figura 21. Acumulación de GMPc en retinas de ojos inyectados con vehículo o AH durante 3 ó 6 semanas. La acumulación del nucleótido aumentó significativamente a las 3 pero no a las 6 semanas de tratamiento con AH. Se representan las medias ± EE (n = 10 -12 retinas/grupo). No se observaron diferencias significativas entre las retinas de ojos inyectados con vehículo y de ojos intactos (n = 10-12 retinas/grupo). **p< 0,01 vs. ojos inyectados con vehículo, test de Tukey.

Estos resultados sugieren que la hipertensión ocular inducida por HA provoca una activación del sistema nitrérgico retiniano.

2. Efecto de la melatonina como herramienta terapéutica para el tratamiento de las alteraciones funcionales e histológicas inducidas por hipertensión ocular crónica

2.1. Estudio del efecto in vitro de la melatonina sobre los sistemas involucrados en la fisiopatogenia del glaucoma

Como se mencionó en la Introducción, trabajos previos de nuestro laboratorio demuestran que la hipertensión ocular inducida por AH provoca un aumento en los niveles sinápticos de glutamato, y una disminución de la actividad del sistema antioxidante endógeno y de los niveles sinápticos de GABA. Estos resultados previos, junto con los resultados presentados en la sección anterior, sugieren que los sistemas glutamatérgico, GABAérgico, y nitrérgico, así como el daño oxidativo podrían constituir mecanismos causales del daño funcional e histológico inducido por la hipertensión ocular crónica. Con el objeto de evaluar el efecto de la melatonina como una herramienta terapéutica para el tratamiento del glaucoma, en una primera serie de experimentos, se analizó el efecto de la melatonina sobre los posibles mecanismos etiopatogénicos involucrados en esta neuropatía óptica. Para ello, se examinó el efecto in vitro de la melatonina sobre algunos de los componentes del ciclo glutamato/glutamina. En la Figura 22 se representa el efecto de la melatonina sobre el influjo de L-^{3}H-glutamato. En concentraciones de 1 y 10 nM la melatonina aumentó significativamente este parámetro. A continuación, se analizó el efecto de la melatonina sobre la conversión de glutamato a glutamina. Como se muestra en la Figura 22, la melatonina aumentó significativamente la actividad de glutamina sintetasa retiniana, en todas las concentraciones estudiadas. Por último, se determinó el efecto de la melatonina sobre la actividad de glutaminasa retiniana (Figura 22). La melatonina (0,1 nM - 10 nM) disminuyó significativamente la conversión de glutamina a glutamato.

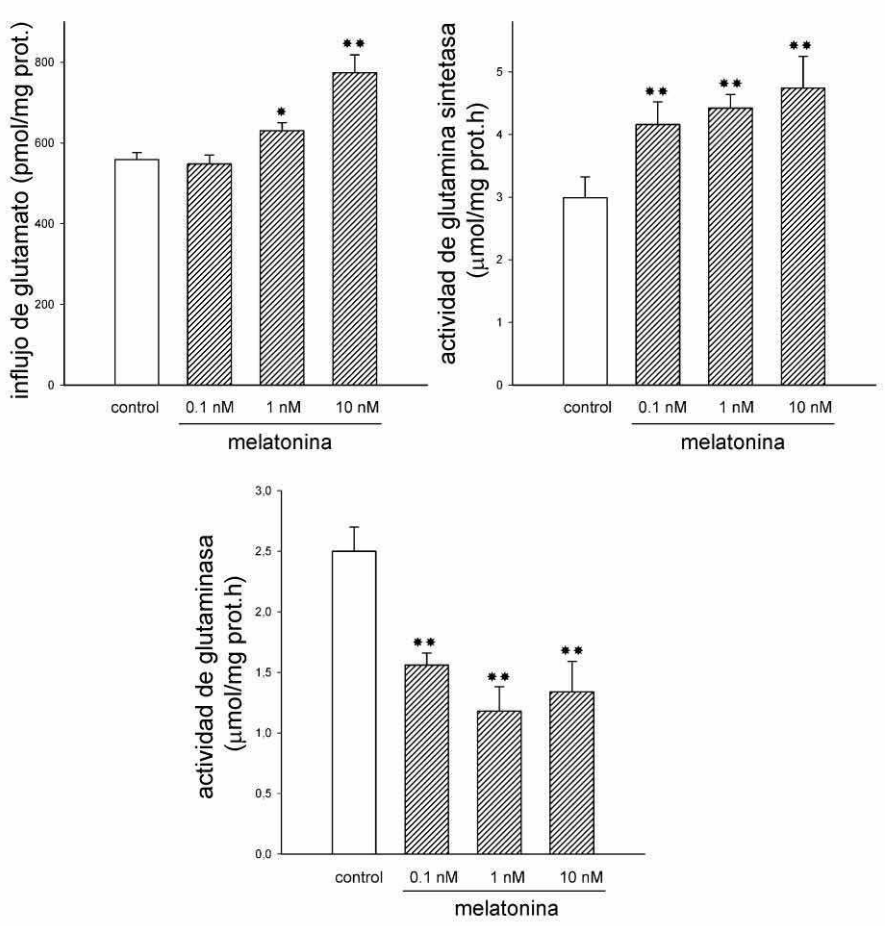

Figura 22. Efecto de la melatonina sobre el influjo de L-^{3}H-glutamato y sobre la actividad de glutamina sintetasa y glutaminasa. Las retinas se incubaron durante 30 minutos en presencia o ausencia de melatonina (0,1 - 10 nM). Luego, los tejidos se homogeneizaron y estos parámetros se evaluaron como se describió en Materiales y Métodos. La melatonina aumentó significativamente el influjo de glutamato y la actividad de glutamina sintetasa y disminuyó la actividad de glutaminasa. Se representan las media ± EE (n = 8 – 10 animales/grupo). * $p< 0,05$, ** $p< 0,01$ vs. control, test de Dunnet.

Con el objeto de analizar el efecto de la melatonina sobre el sistema GABAérgico retiniano, se determinó el efecto de una inyección intravítrea de melatonina sobre el turnover de GABA y la actividad de glutámico decarboxilasa (GAD). Como se muestra en las Figura 23, la melatonina en una concentración de 100 nM aumentó significativamente ambos parámetros.

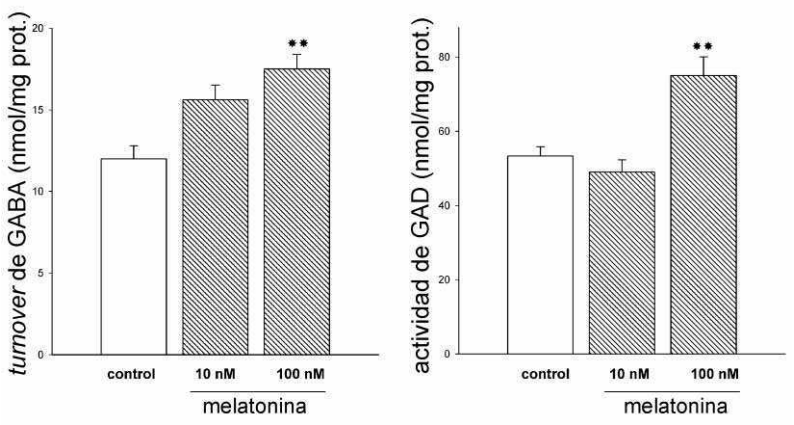

Figura 23. Efecto de la melatonina sobre el turnover retiniano de GABA y la actividad de GAD. La melatonina se inyectó en la cámara intravítrea de un ojo, mientras que el ojo contralateral se inyectó con vehículo. Tres horas después de la inyección, los animales fueron sacrificados y el turnover de GABA y la actividad de GAD se determinaron como se describió en Materiales y Métodos. La melatonina (100 nM) aumentó significativamente ambos parámetros. Se representan las media ± EE (n = 8-10 animales/grupo). **p< 0,01 vs. control, test de Dunnett.

Para analizar el efecto de la melatonina sobre la actividad del sistema nitrérgico retiniano, se examinó el efecto in vitro del metoxiindol sobre la actividad de NOS y el influjo de L-arginina (Figura 24). La melatonina disminuyó significativamente la conversión retiniana de L-^{3}H-arginina en L- ^{3}H-citrulina, así como el influjo de L-arginina.

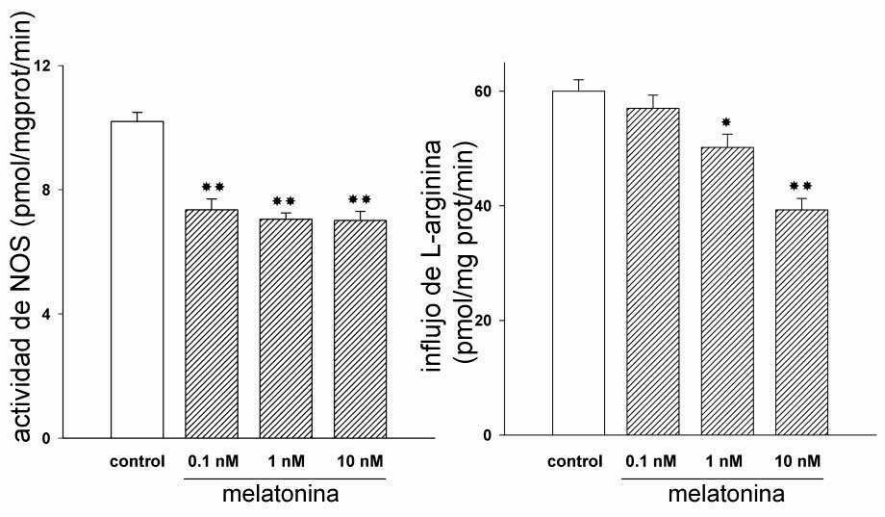

Figura 24. Efecto de la melatonina sobre la actividad retiniana de NOS y el influjo de L-arginina. Las retinas se incubaron durante 15 minutos en presencia o ausencia de la melatonina (0,1-10 nM). Luego, los tejidos se homogeneizaron y procesaron como se describió en Materiales y Métodos. Para el uptake de L-arginina, las fracciones sinaptosomales retinianas se preincubaron con melatonina durante 15 minutos antes del experimento. La melatonina

disminuyó significativamente la actividad retiniana de NOS en todas las concentraciones examinadas y el influjo de L-arginina en concentraciones de 1 y 10 nM. Se representan las medias ± EE (n = 8 - 10 animales/grupo), *p< 0,05, **p< 0,01 vs. control, test de Dunnett.

A continuación, se examinó el efecto de la melatonina sobre la actividad del sistema de defensa antioxidante endógeno retiniano. En la Figura 25 se representa el efecto in vitro de la melatonina sobre la actividad retiniana de superóxido dismutasa (SOD). La melatonina aumentó significativamente la actividad de esta enzima a partir de una concentración de 1 nM. En el rango de concentraciones examinadas (0,1 a 10 nM), la melatonina no modificó la actividad retiniana de catalasa (datos no mostrados). La melatonina en una concentración de 10 nM aumentó significativamente los niveles de glutatión reducido (GSH) (Figura 25) y disminuyó significativamente la peroxidación lipídica retiniana en concentraciones de 1 y 10 nM (Figura 25).

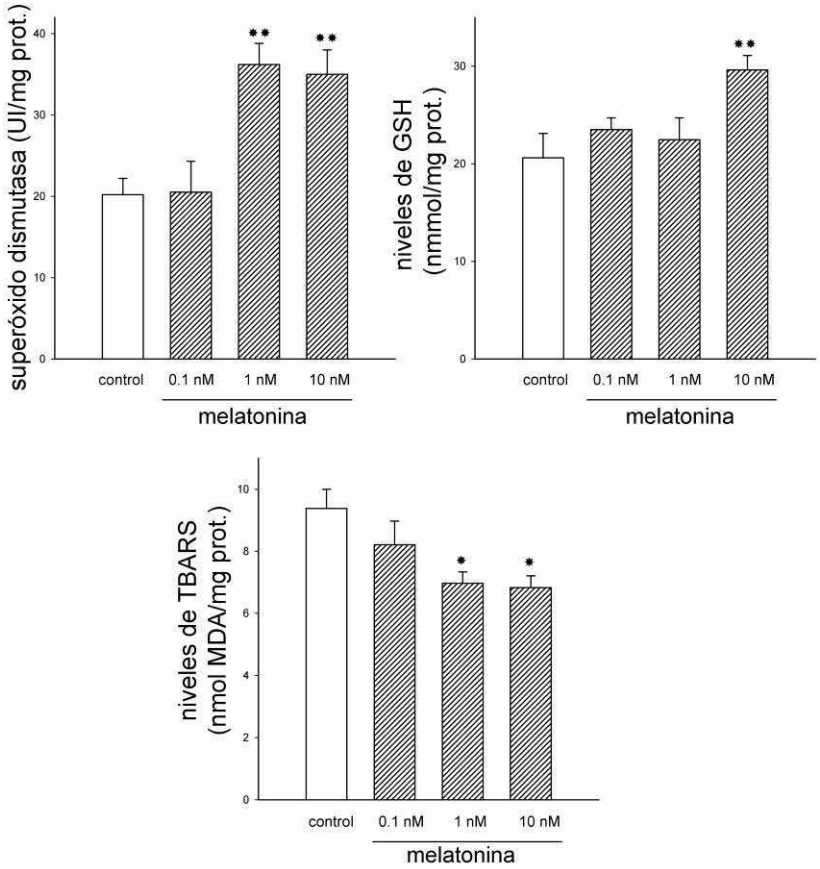

Figura 25. Efecto de la melatonina sobre la actividad retiniana de SOD, y los niveles de GSH y TBARS. Las retinas se incubaron durante 30 minutos en ausencia o presencia de melatonina (0,1-10 nM). Luego, las retinas se homogeneizaron y se

evaluaron estos parámetros como se describió en Materiales y Métodos. La melatonina aumentó significativamente la actividad de SOD y los niveles de GSH, y disminuyó los niveles de TBARS. Se representan las medias ± EE (n = 8 – 10 animales/grupo), *p< 0,05, **p< 0,01 vs. control, test de Dunnett.

Este conjunto de evidencias indican que la melatonina provoca mayoritariamente efectos de signo opuesto a los inducidos por la hipertensión ocular sobre los sistemas glutamatérgico, GABAérgico, nitrérgico y antioxidante, lo que podría sugerir el uso de este metoxiindol con fines terapéuticos en el glaucoma. El análisis de esta hipótesis constituyó el objetivo de la serie de experimentos que se describirán a continuación.

2.2. Estudio del efecto de la melatonina sobre las alteraciones funcionales e histológicos inducidas por la hipertensión ocular crónica

Con el fin de examinar el efecto de la melatonina sobre las alteraciones funcionales inducidas por la inyección intracameral semanal de AH, se implantó un pellet subcutáneo de 20 mg de melatonina antes de la primera inyección de AH que se reemplazó cada 15 días. El tratamiento con melatonina no afectó la PIO en ojos inyectados con vehículo o AH a las 3, 6 ó 10 semanas de tratamiento, como se muestra en la Figura 26.

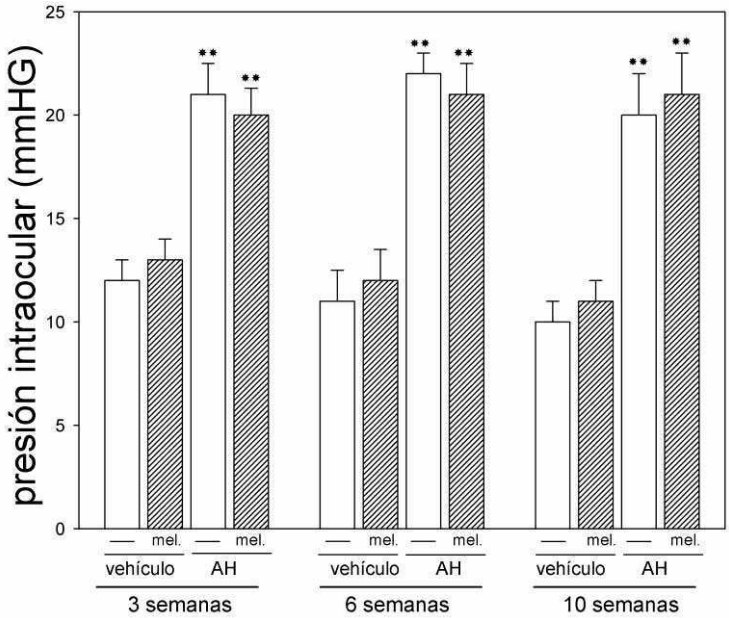

Figura 26. Efecto de la melatonina sobre la PIO. Los ojos se inyectaron una vez por semana con vehículo o AH durante 3, 6 ó 10 semanas, en ausencia o presencia de melatonina y la PIO se determinó 3 días después de la última inyección en cada caso. En todos los intervalos estudiados, la melatonina no afectó la PIO en los ojos inyectados con vehículo o AH. Se representan las medias ± EE (n = 8 – 10 animales/grupo). **p< 0,01 vs. ojos inyectados con vehículo, test de Tukey.

ontinuación, con el objeto de evaluar el efecto de la melatonina sobre las alteraciones funcionales inducidas por hipertensión ocular, se registraron ERGs escotópicos a diferentes períodos de tratamiento con AH. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 27. La implantación del pellet subcutáneo de melatonina previno los cambios electrorretinográficos observados en ratas tratadas con AH, tanto a las 6 como a las 10 semanas de hipertensión ocular. En animales intactos, la melatonina no modificó la respuesta electrorretinográfica escotópica ni a las 6 ni a las 10 semanas de tratamiento. En el panel inferior de la Figura 27 se muestran ERGs representativos de todos los grupos experimentales

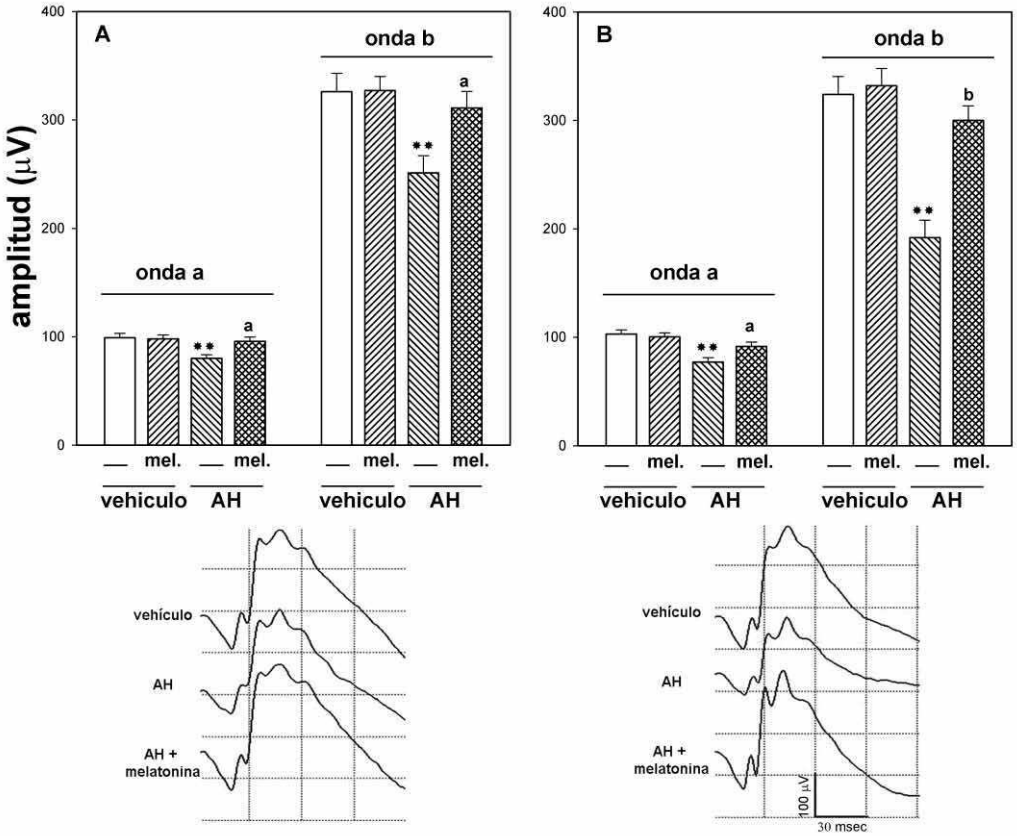

Figura 27. Efecto preventivo de la melatonina sobre la disfunción retiniana inducida por hipertensión ocular crónica. Se inyectaron los ojos con vehículo o AH durante 6 ó 10 semanas en ausencia o presencia de melatonina y se registró el ERG en ambos intervalos. A las 6 (A) y 10 semanas (B) de tratamiento, el AH indujo una disminución significativa en la amplitud de las ondas a y b del ERG con respecto a los ojos inyectados con vehículo. El tratamiento con melatonina previno significativamente el efecto de la hipertensión ocular. La melatonina no afectó estos parámetros en los ojos inyectados con vehículo. Se representan las medias ± EE (n= 8 - 10 animales/grupo). **p< 0,01 vs. ojos inyectados con

vehículo. a: p< 0,05, b: p< 0,01 vs. ojos inyectados con AH, test de Tukey. Panel inferior: ERGs representativos de los distintos grupos experimentales

El tratamiento con melatonina disminuyó significativamente la pérdida de células en la capa de células ganglionares (CCG) inducida por hipertensión ocular, como se muestra en la Figura 28.

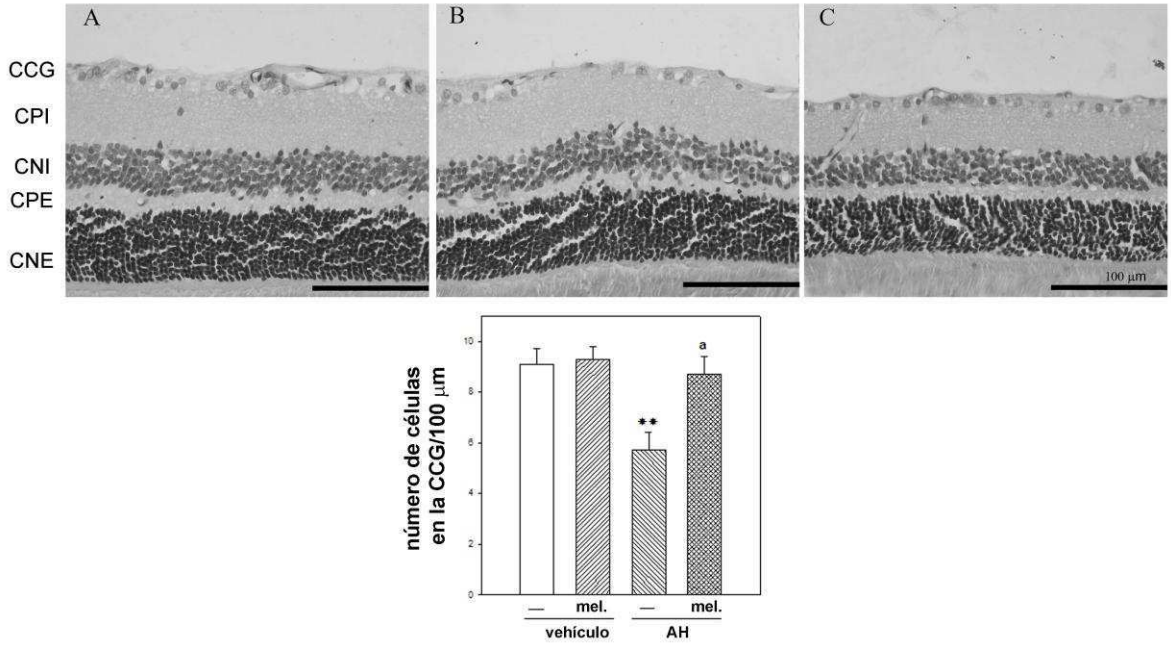

Figura 28. Secciones transversales de retinas de un animal tratado con vehículo (A) o AH durante 10 semanas en ausencia (B) o presencia de melatonina (C). En el ojo inyectado con AH se observó una disminución significativa en el número de células en la CCG, en tanto que la melatonina, que no afectó este parámetro en ojos inyectados con vehículo, previno significativamente el efecto de la hipertensión ocular. Las capas restantes de la retina mostraron una apariencia normal en todos los grupos experimentales. CPI: capa plexiforme interna; CNI: capa nuclear interna; CPE: capa plexiforme externa; CNE: capa nuclear externa. Hematoxilina & Eosina (H&E). Panel inferior: Cuantificación de células en la CCG/100 µm ± EE (n = 5 animales/grupo). **p< 0,01 vs. ojos inyectados con vehículo, a: p< 0,05 vs. ojos inyectados con AH, test de Tukey.

A continuación, se analizó el efecto terapéutico de la melatonina sobre la neuropatía glaucomatosa. Para ello, se implantó un pellet de melatonina a las 6 semanas de hipertensión ocular y se realizaron estudios funcionales e histológicos a las 10 semanas de tratamiento con

AH. Como se muestra en la Figura 29, la melatonina evitó la disminución de las amplitudes de las ondas a y b del ERG inducida por las inyecciones de AH.

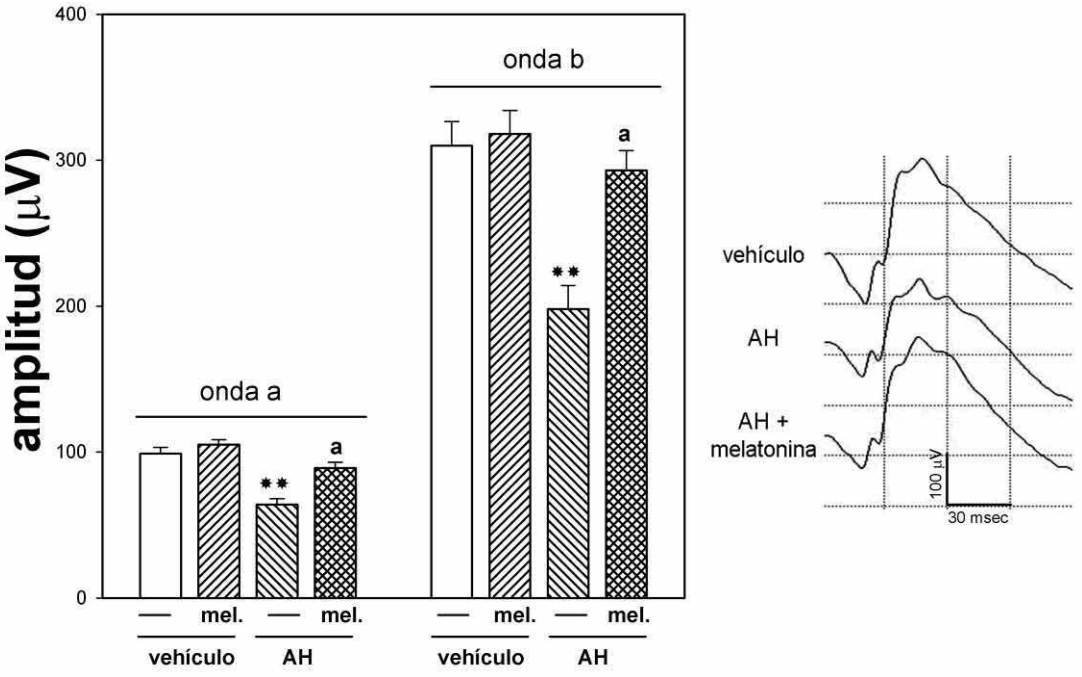

Figura 29. Efecto terapéutico de la melatonina sobre la disfunción retiniana inducida por hipertensión ocular crónica. Luego de 6 inyecciones semanales de vehículo o AH se implantó de forma subcutánea un pellet de melatonina que fue reemplazado cada 15 días hasta el final del experimento. Las inyecciones de AH se repitieron una vez por semana y se evaluó la función retiniana a las 10 semanas de hipertensión ocular. Panel de la izquierda: amplitudes promedio de las onda a y b del ERG escotópico. La hipertensión ocular disminuyó significativamente estos parámetros, en tanto que el tratamiento con melatonina revirtió significativamente el efecto de la hipertensión ocular. Se representan las medias ± EE (n = 8 - 10 animales/grupo). **p< 0,01 vs. ojos inyectados con vehículo, a: p< 0,05 vs. ojos inyectados con AH, test de Tukey. Panel de la derecha: ERGs representativos de los distintos grupos experimentales.

El tratamiento con melatonina, que no afectó per se el número de células en la CCG en los ojos inyectados con vehículo, evitó la disminución en el número de células en la CCG en retinas de ojos con hipertensión ocular (Figura 30).

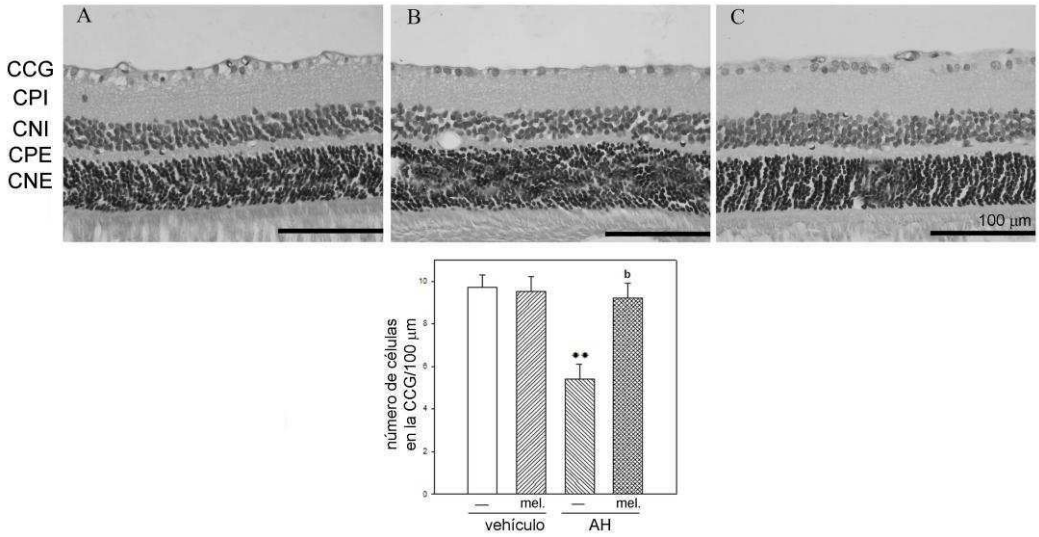

Figura 30. Efecto de la melatonina sobre la pérdida de células en la CCG inducida por hipertensión ocular crónica. El pellet de melatonina se implantó a las 6 semanas de tratamiento con vehículo o AH y fue reemplazado cada 15 días hasta el final del experimento. A las 10 semanas del tratamiento, se observó una disminución significativa en el número de células en la CCG en los ojos inyectados con AH (B), en comparación con los ojos inyectados con vehículo (A). El tratamiento con melatonina (C) revirtió significativamente el efecto de la hipertensión ocular inducida por AH. H&E. Panel inferior: Cuantificación de células en la CCG/100 µm ± EE (n = 5 animales/grupo). **p< 0,01 vs. ojos inyectados con vehículo; b: p< 0,01 vs. ojos inyectados con AH, test de Tukey.

3. Desarrollo de un modelo experimental de glaucoma en ratas

Como se mencionó en la Introducción, en trabajos previos de nuestro laboratorio se demostró que la administración semanal de AH en la cámara anterior del ojo reproduce aspectos centrales del glaucoma humano y en el marco de este trabajo de Tesis se utilizó este modelo en los experimentos previamente descriptos. Sin embargo, la utilización de este modelo tuvo que ser abandonada porque la empresa fabricante de este reactivo (Sigma®) interrumpió en forma definitiva la producción de este tipo particular de AH (catálogo # H1751). Hemos realizado múltiples intentos para reemplazar este producto con reactivos similares de ésta u otras empresas, pero no hemos logrado reproducir los resultados originales obtenidos con el tipo de AH con el que se realizaron estos experimentos. Por lo tanto, el objetivo de la serie de experimentos que se describirá a continuación, fue desarrollar un modelo de glaucoma experimental alternativo. Para ello, considerando los antecedentes mencionados sobre la

relevancia de los glicosaminoglicanos (GAGs) como barrera al pasaje de humor acuoso, así como el hecho de que el condroitín sulfato (CS) junto con el AH son los principales GAGs de la red trabecular, se examinó el efecto de la administración intracameral de CS sobre la PIO, la función y la histología retiniana. Los resultados obtenidos se describen a continuación.

En una primera serie de experimentos, se inyectaron animales con diferentes concentraciones de CS en un ojo y vehículo en el ojo contralateral y se determinó la PIO en ambos ojos de cada animal 24 h después de la inyección. La Figura 31 muestra los valores de PIO de ojos inyectados con vehículo o CS (10, 20 ó 40 %). Se observó un aumento leve pero no significativo de la PIO en los ojos inyectados con 10 ó 20% de CS, mientras que la inyección con CS al 40% aumentó significativamente este parámetro.

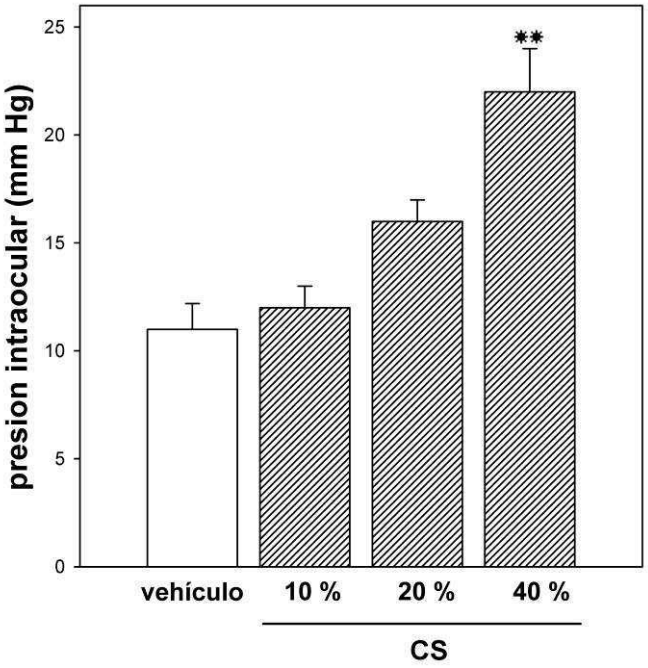

Figura 31. Efecto de una única inyección intracameral de CS sobre la PIO en ratas. Los ojos se inyectaron con vehículo o CS (10 - 40%), 24 h antes de la determinación de la PIO. Se observó un aumento significativo de este parámetro en los ojos inyectados con 40 (pero no con 10 ó 20) % de CS. Se representan las medias ± EE (n = 10 ojos / grupo). **p< 0,01 vs. ojos inyectados con vehículo, test de Dunnett.

Con el fin de analizar el curso temporal del efecto del CS sobre la PIO, los animales se inyectaron con una única inyección de CS al 40% en un ojo, mientras que el ojo contralateral se inyectó con vehículo y se determinó la PIO en ambos ojos antes de la inyección (día 0) y diariamente, a partir de 24 h post-inyección, como se muestra en la Figura 32. La inyección de CS indujo un aumento de casi el doble de la PIO que duró siete días, mientras que en el 8vo día post- inyección, la PIO en los ojos inyectados con CS alcanzó valores similares al control.

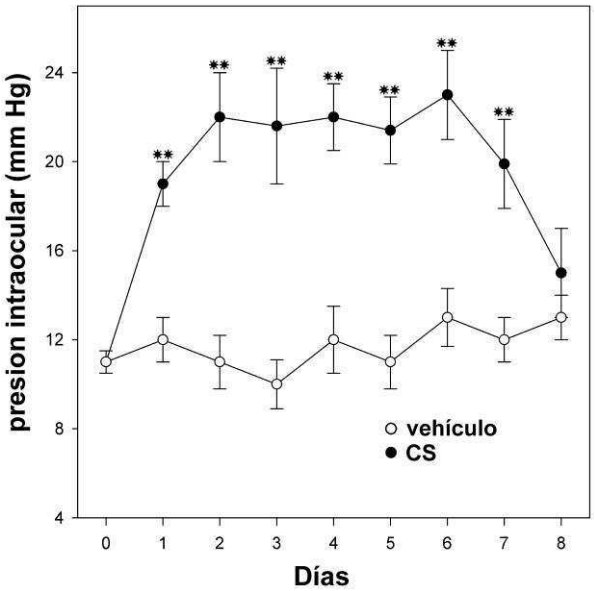

Figura 32. Determinaciones tonométricas de la PIO en ojos tratados con una única inyección intracameral de solución salina (círculos blancos) o CS (círculos negros). Las inyecciones se realizaron en el día 0, y se evaluó la PIO en ambos grupos experimentales todos los días hasta el día 8 post-inyección. El CS aumentó significativamente la PIO hasta el día 7 post-inyección. Se representan las medias ± EE (n = 10 ojos / grupo). **p< 0,01 vs. ojos inyectados con solución salina en los mismos intervalos post-inyección, test de Student.

Con el objeto de inducir una hipertensión ocular persistente en el tiempo, los animales se inyectaron una vez por semana con CS (en un ojo) y vehículo (en el ojo contralateral) y la PIO se determinó a intervalos de 7 días en ambos ojos de cada animal, antes de una nueva inyección. Los valores promedio de PIO de estos animales evaluados semanalmente se muestran en la Figura 33. La PIO de los ojos tratados con CS alcanzó un nivel de estado estacionario que fue significativamente mayor que la de los ojos inyectados con solución salina, que se prolongó a lo largo de la duración del estudio (10 semanas). Tanto en el estudio agudo como crónico, se observó un alto grado de consistencia en los valores de PIO en los ojos inyectados con CS.

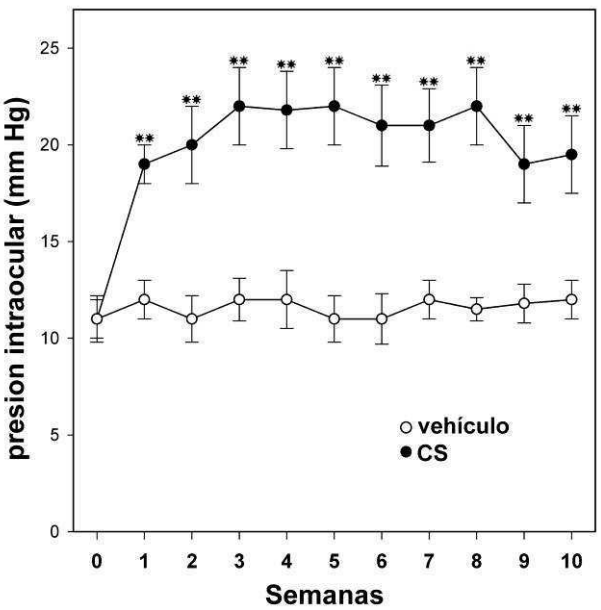

Figura 33. Efecto de la administración crónica de CS sobre la PIO. Se realizaron inyecciones semanales de solución salina (círculos blancos) o CS (círculos negros), después de la determinación de la PIO. El CS indujo una hipertensión ocular persistente a lo largo de todo el tratamiento. Se representan las medias ± EE (n = 20 ojos/grupo). **p< 0,01 vs. ojos inyectados con solución salina, test de Student.

La continuación de estos experimentos consistió en la evaluación del efecto de la hipertensión ocular inducida por CS sobre la función y la histología retiniana. Para ello, el estado funcional retiniano se examinó por electrorretinografía escotópica. Las amplitudes promedio de las ondas a y b del ERG escotópico de ratas inyectadas semanalmente con vehículo en un ojo y CS en el ojo contralateral durante 6 semanas se muestra en la Figura 34. En el panel derecho de la misma Figura se muestran registros electrorretinográficos representativos. Tanto la amplitud de la onda a como de la onda b del ERG disminuyeron significativamente en los ojos inyectados con CS respecto a los inyectados con vehículo. A las 3 semanas de tratamiento con vehículo o CS, no se observaron cambios electrorretinográficos significativos (datos no mostrados).

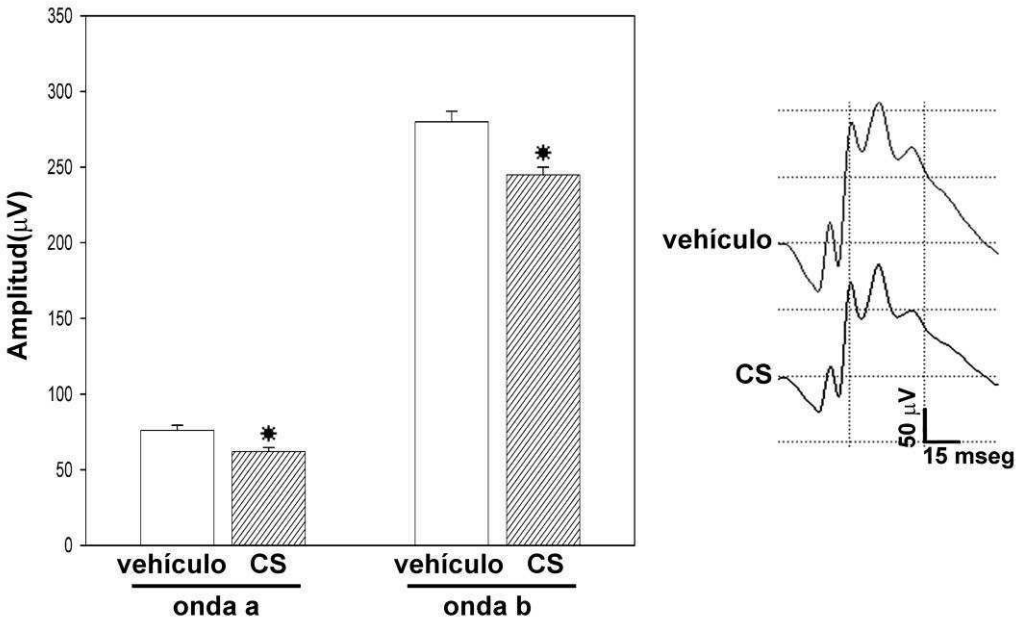

Figura 34. ERGs escotópicos de ojos inyectados con vehículo o CS. Los animales se inyectaron semanalmente con CS en un ojo y solución salina en el ojo contralateral durante 6 semanas. En el panel izquierdo se representan las amplitudes promedio de las ondas a y b del ERG escotópico y en el panel derecho se muestran ERGs representativos de ambos grupos. Se observó una disminución significativa en la amplitud de las ondas a y b en los ojos inyectados con CS durante 6 semanas. Se representan las medias ± EE (n = 20 ojos / grupo), *p< 0,05 vs. ojos inyectados con vehículo, test de Student

Estudios similares se realizaron a las 10 semanas de tratamiento con vehículo o CS (Figura 35). En estas condiciones, se observó una reducción adicional en la amplitud de las ondas a y b del ERG en los ojos inyectados con CS durante 10 semanas. El tratamiento con CS durante 6 ó 10 semanas no afectó las latencias de las ondas a y b en comparación con los ojos inyectados con vehículo.

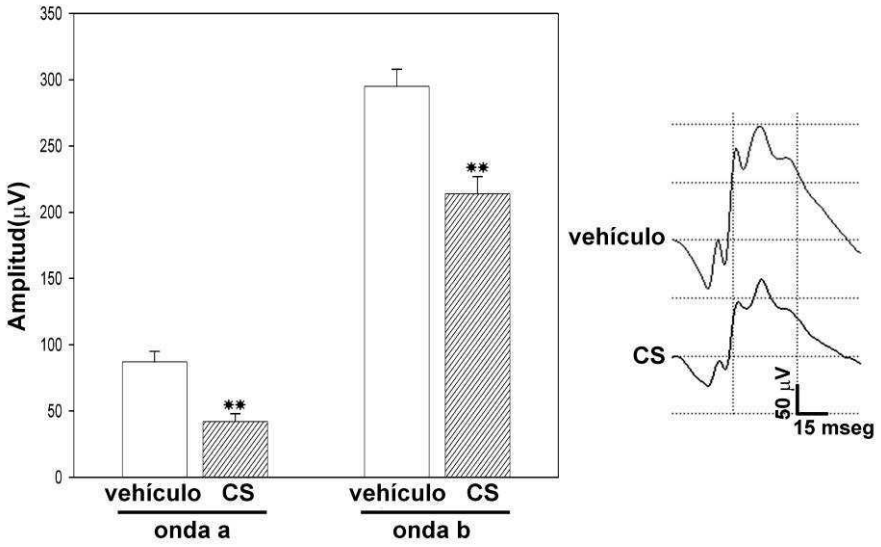

Figura 35. ERGs escotópicos de ojos inyectados con vehículo o CS durante 10 semanas. En el panel izquierdo se representan las amplitudes promedio de las ondas a y b del ERG escotópico y en el panel derecho se muestran ERGs representativos. Se observó una disminución significativa en la amplitud de las ondas a y b en los ojos inyectados con CS durante 10 semanas. Se representan las medias ± EE (n = 20 ojos / grupo), **p< 0,01 vs. ojos inyectados con vehículo, test de Student.

Para evaluar la función de la vía visual, se registraron potenciales visuales evocados (VEPs) por un flash de luz, a las 3, 6 y 10 semanas de hipertensión ocular inducida por inyecciones semanales de CS. Se observó una disminución significativa en la amplitud del componente N2-P2 del VEP en los ojos inyectados con CS durante 6 ó 10 semanas en comparación con los ojos inyectados con vehículo, sin cambios evidentes en las latencias, como se muestra en el panel izquierdo de la Figura 36. En el panel derecho de esta Figura se muestran registros representativos de los VEPs para todos los grupos experimentales. No se observaron cambios en la amplitud del componente N2-P2 del VEP luego de 3 semanas de hipertensión ocular inducida por CS (datos no mostrados). Los ERGs y los VEPs en ojos intactos no difirieron significativamente de los registrados en ojos inyectados con vehículo durante 3, 6 ó 10 semanas (datos no mostrados).

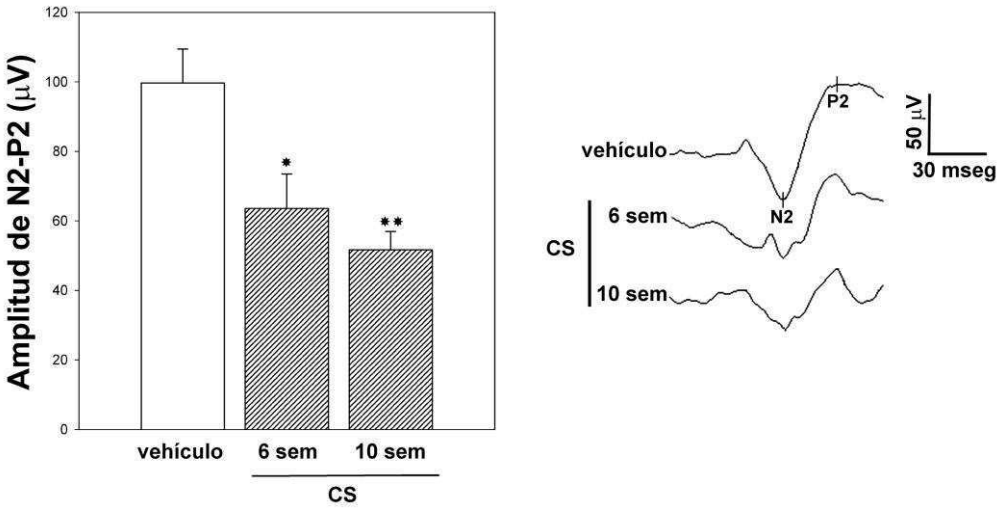

Figura 36. VEPs en ratas inyectadas con vehículo en un ojo y CS en el ojo contralateral durante 6 ó 10 semanas. En el panel izquierdo se representa la amplitud promedio del componente N2-P2 y el panel de la derecha muestra registros representativos. Se observó una disminución significativa de este parámetro en los ojos inyectados con CS por 6 ó 10 semanas. Se representan las medias ± EE (n = 20 ojos / grupo), *p< 0,05, **p< 0,01 vs. ojos inyectados con vehículo, test de Dunnett.

A continuación, se realizó un análisis histológico de la retina y del nervio óptico en ojos inyectados con vehículo o CS. Se observaron cambios significativos en ambas estructuras en los ojos inyectados con CS durante 10 semanas. Aunque el espesor total de la retina y de la CPI, la CNI y la CNE no difirió entre los ojos inyectados con vehículo o CS (Tabla II), se observó una disminución significativa en el número de células en la CCG en los ojos inyectados con CS durante 10 semanas (Figura 37). El número promedio de células en la CCG/100 μm ± EE del grupo control fue 9,2 ± 0,5 mientras que en los ojos inyectados con CS, este valor fue 5,9 ± 0,7 (p< 0,01, n = 5 retinas/grupo). A las 3 ó 6 semanas de tratamiento con vehículo o CS no se observaron alteraciones histológicas en la retina o el nervio óptico (datos no mostrados).

Tabla II. Espesor total de la retina y sus capas.

	10 semanas de tratamiento	
	vehículo (μm)	CS (μm)
Total	132 ± 7	129 ± 6,8
CPI	32,7 ± 4,6	31,6 ± 4,2
CNI	25 ± 2,8	23,3 ± 2,3
CNE	37,1 ± 3	35,5 ± 4,7

Se determinó el espesor total de la retina y sus capas en ojos inyectados con vehículo o CS durante 10 semanas. No se observaron diferencias significativas en ninguno de estos parámetros entre ambos grupos experimentales.

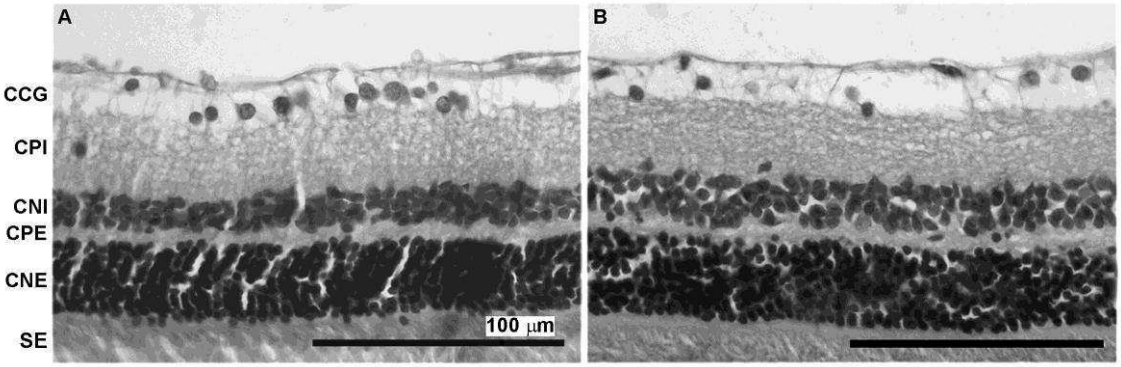

Figura 37. Secciones transversales de retinas de un ojo inyectado con solución salina (A) y un ojo (contralateral) inyectado con CS durante 10 semanas (B). Nótese la disminución del número de células en la CCG en el ojo inyectado con CS. Las capas restantes de la retina mostraron un aspecto similar en ambos grupos. H&E.

Luego, se analizaron los nervios ópticos de los ojos inyectados con vehículo o CS. Los axones del nervio óptico de los ojos inyectados con vehículo presentaron una forma uniforme (redondeada) y un tamaño variable (Figura 38). En el nervio óptico de los ojos tratados con CS durante 10 semanas se observó una pérdida global de uniformidad e integridad axonal (Figura 38). En los ojos tratados con CS se observó un aumento en la distancia entre los haces de axones. Los axones individuales del nervio óptico de los ojos inyectados con CS también mostraron distensiones y distorsiones y se apartaron de la morfología circular característica de axones normales (Figura 38).

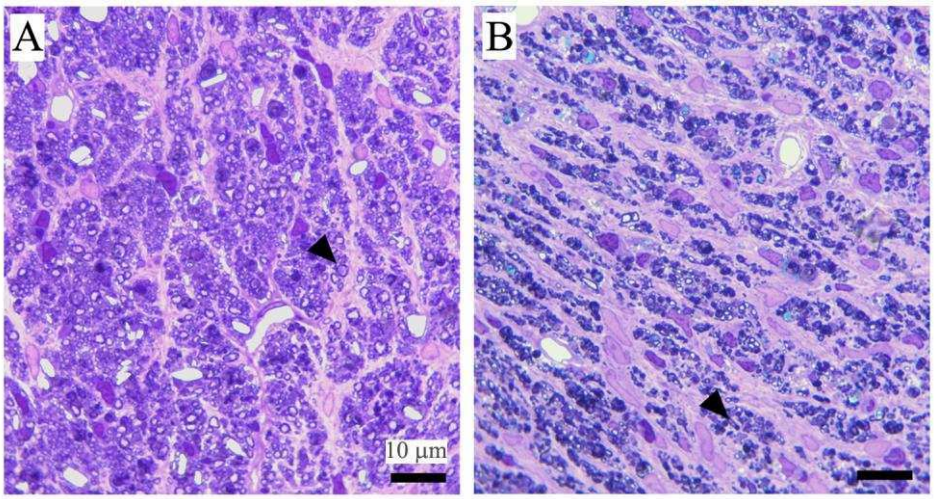

Figura 38. Imágenes de secciones transversales del nervio óptico en un ojo inyectado con vehículo (A) y un ojo inyectado con CS durante 10 semanas (B). Nótese la homogeneidad de la tinción en el nervio óptico control, que se corresponde con un nervio sano. Los axones individuales mostraron formas uniformes, generalmente redondeadas y empaquetados en forma estrecha, formando fibras de un nervio sano (punta de flecha). En el nervio del ojo tratado con CS se observó una menor densidad de fibras. La apariencia de los axones individuales se caracterizó por distensión y distorsión axonal que se apartó de la morfología circular de axones normales (punta de flecha). Tinción con azul de toluidina.

Para analizar la influencia del diámetro axonal sobre la pérdida de axones inducida por la hipertensión ocular, se comparó el número de axones en tres rangos de diámetro comprendidos entre 0,05 y 0,6 µm en ambos grupos experimentales (Figura 39). En los ojos inyectados con CS durante 10 semanas se observó una pérdida significativa de axones medianos y grandes, pero no de axones de diámetro pequeño.

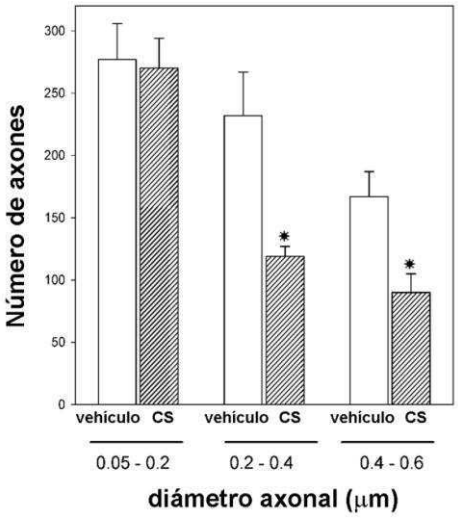

Figura 39. Distribución del diámetro axonal en ojos inyectados con vehículo o CS durante 10 semanas. En los ojos inyectados con CS se observó una disminución significativa en el número de axones medianos y grandes, pero no de axones pequeños. Se representan las medias ± EE (n = 5 ojos / grupo) *p< 0,05 vs. ojos inyectados con vehículo, test de Student.

Este conjunto de resultados indica que la administración crónica intracameral de CS reproduce características centrales del glaucoma crónico de ángulo abierto humano y por lo tanto, este modelo podría ser una herramienta útil en la búsqueda de estrategias terapéuticas para el tratamiento de esta disfunción ocular.

4. La tolerancia isquémica protege la retina de la rata del daño glaucomatoso

Basado en la alta efectividad de la protección inducida por PCI y PostC frente a un daño isquémico agudo y considerando las evidencias que avalan la participación de un componente isquémico en el daño glaucomatoso, se evaluó el efecto de la aplicación de pulsos breves de isquemia en el modelo de hipertensión ocular crónico inducido por CS. Para ello, la aplicación de pulsos de 5 min de isquemia se inició a partir de la 6ta semana de hipertensión ocular y se repitió una vez por semana hasta la 10ma inyección de CS.

La Tabla III muestra el promedio de la PIO de ojos inyectados semanalmente con vehículo o CS sometidos a pulsos de isquemia o procedimiento simulado a las 6, 7, 8, 9 y 10 semanas de inyecciones intracamerales de vehículo o CS. La PIO fue significativamente mayor en ojos inyectados con CS que con vehículo. Los pulsos de isquemia no modificaron este parámetro en ninguno de los grupos experimentales y en ninguno de los intervalos estudiados.

Tabla III. Efecto de los pulsos de isquemia sobre la PIO en ojos inyectados con vehículo o CS

	Presión intraocular (mmHg)			
	vehículo		CS	
	sham	pulsos	sham	pulsos
6 semanas	11,3 ± 0,5	12,1 ± 0,8	22,1 ± 1,1**	21,4 ± 1,6**
7 semanas	11,8 ± 0,8	11,8 ± 0,6	24,6 ± 1,5**	22,3 ± 1,5**
8 semanas	12,0 ± 0,6	11,9 ± 0,7	23,4 ± 1,3**	24,6 ± 1,0**
9 semanas	11,7 ± 0,8	12,1 ± 0,9	24,8 ± 1,6**	23,9 ± 1,5**
10 semanas	11,9 ± 0,6	11,5 ± 0,7	22,0 ± 1,0**	21,4 ± 1,5**

Determinación de la PIO en ojos inyectados bilateralmente con vehículo o CS y sometidos a un procedimiento simulado (sham) o pulsos de isquemia. Se evaluó la PIO a los 6, 7, 8, 9 y 10 semanas de tratamiento con vehículo o CS. En todos los intervalos estudiados, el CS aumentó significativamente la PIO en comparación con los ojos inyectados con vehículo. Los pulsos de isquemia no modificaron este parámetro en los ojos inyectados con vehículo o

CS a lo largo de todo el estudio. Se representan las medias ± EE (n = 10 animales por grupo).
**p< 0,01 vs. ojos inyectados con vehículo sin pulsos de isquemia (sham), test de Tukey.

Con el fin de evaluar el efecto de los pulsos de isquemia sobre las alteraciones funcionales inducidas por hipertensión ocular, se registraron ERGs escotópicos en todos los grupos experimentales. En la Figura 40 se representa la amplitud promedio de las ondas a y b del ERG escotópico de animales inyectados en forma bilateral con vehículo o CS durante 10 semanas y sometidos a pulsos breves de isquemia semanales en un ojo y un procedimiento simulado en el ojo contralateral. Estos parámetros fueron significativamente disminuidos en los ojos que recibieron CS con procedimiento simulado en comparación con los ojos inyectados con vehículo. La aplicación de pulsos de isquemia evitó la disminución de la amplitud de las ondas a y b del ERG en los ojos con hipertensión ocular. En el panel inferior de la Figura 40 se muestran registros representativos de los ERGs escotópicos para todos los grupos experimentales.

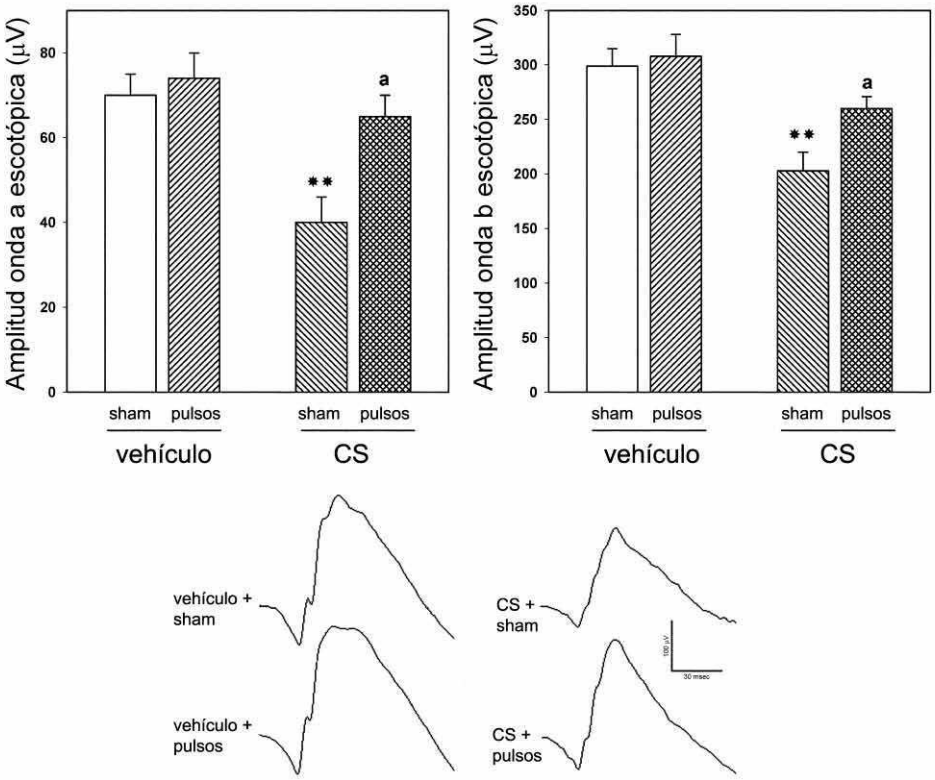

Figura 40. Preservación electrorretinográfica en ojos hipertensos inducida por la

aplicación de pulsos breves de isquemia. Se registraron ERGs a las 10 semanas de tratamiento con vehículo o CS. El CS indujo una disminución significativa en la amplitud de las ondas a y b del ERG, en comparación con los ojos inyectados con vehículo. En los ojos hipertensos sometidos a pulsos de isquemia se observó una preservación significativa de estos parámetros. En el panel inferior se muestran ERGs representativos de los distintos grupos experimentales. Se representan las medias ± EE (n = 10 animales por grupo). **p< 0,01 vs. ojos inyectados con vehículo sin pulsos de isquemia (sham); a: p< 0,05 vs. ojos inyectados con CS sin pulsos de isquemia (sham), test de Tukey.

En cuanto a los VEPs, se observó una disminución significativa en la amplitud del componente N2-P2 del VEP en los ojos inyectados con CS sin pulsos de isquemia en comparación con los inyectados con vehículo, mientras que en los ojos con hipertensión ocular sometidos a pulsos de isquemia se observó una preservación significativa de este parámetro (Figura 41). No se observaron diferencias significativas en los ERGs y VEPs entre ojos inyectados con vehículo sometidos a un procedimiento simulado y ojos inyectados con vehículo sometidos a pulsos de isquemia.

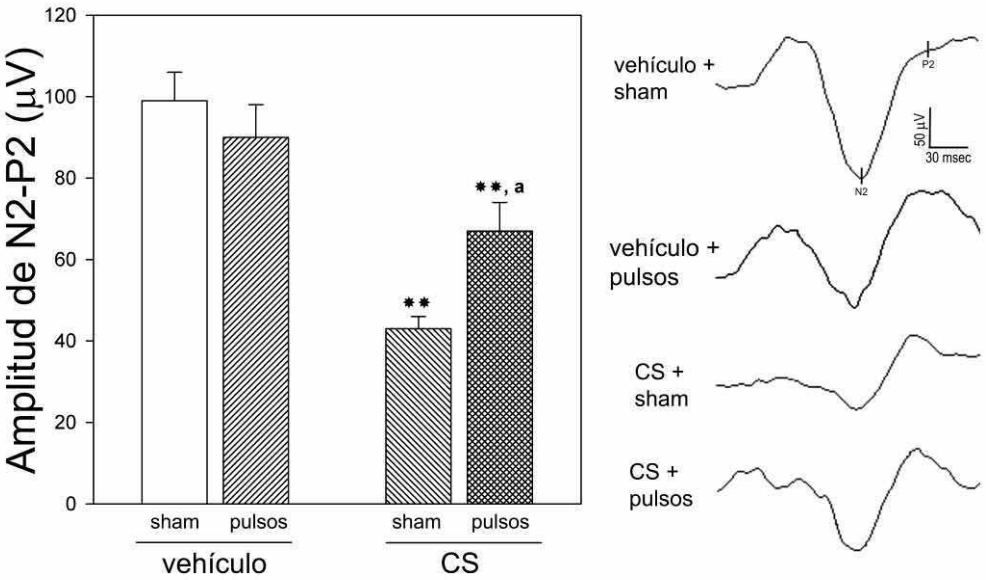

Figura 41. VEPs registrados en los grupos experimentales (ojos inyectados con vehículo o CS, con o sin pulsos de isquemia). Los animales se inyectaron semanalmente con vehículo o CS durante 10 semanas. Los pulsos de isquemia se aplicaron en un ojo, mientras que el ojo contralateral fue sometido a un procedimiento simulado. En el panel izquierdo se representan las amplitudes promedio del componente N2-P2 y en el panel derecho se muestran registros representativos. Se observó una reducción significativa del componente N2-P2 del VEP en los ojos inyectados con CS durante 10 semanas sin pulsos de isquemia. La

aplicación semanal de pulsos de isquemia redujo significativamente el efecto de la hipertensión ocular. No se observaron cambios entre los ojos inyectados con vehículo con o sin pulsos de isquemia. Se representan las medias ± EE (n = 10 ojos / grupo). **p< 0,01 vs. ojos inyectados con vehículo sin pulsos de isquemia (sham), a: p< 0,05 vs. ojos inyectados con CS sin pulsos de isquemia (sham), test de Tukey.

Luego, se examinó el efecto de la aplicación de pulsos breves de isquemia sobre las alteraciones histológicas inducidas por la hipertensión ocular. No se observaron cambios en el espesor total de la retina, la CPI, la CNI y la CNE en ninguno de los grupos experimentales (datos no mostrados). En los ojos tratados con CS y sometidos a un procedimiento simulado se observó una reducción significativa en el número de células en la CCG. La aplicación de pulsos de isquemia evitó la caída en el número de células en la CCG, como se muestra en la Figura 42. Se realizó un estudio inmunohistoquímico utilizando un anticuerpo anti-NeuN (marcador de neuronas maduras) en retinas de ojos inyectados con vehículo o CS con o sin pulsos de isquemia y se determinó el número de células positivas, que fueron contrastadas con el marcador nuclear DAPI (Figura 42). El número de células positivas para NeuN y células marcadas con DAPI en la CCG en retinas de ojos con hipertensión ocular sometidos a pulsos de isquemia fue significativamente mayor que el observado en ojos con hipertensión ocular sometidos a un procedimiento simulado (Figura 42).

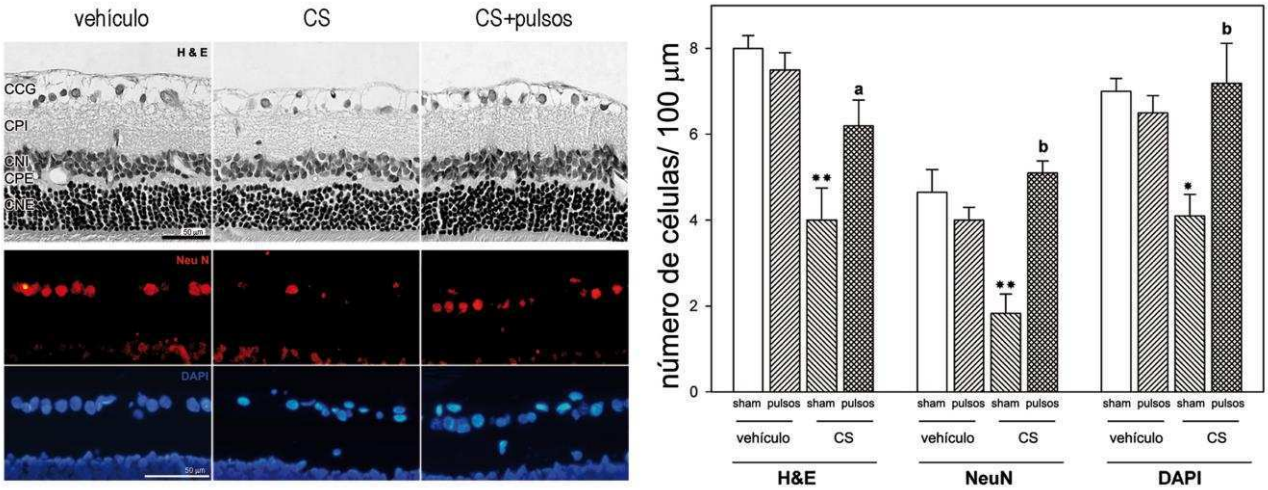

Figura 42. Histología de la retina a las 10 semanas de hipertensión ocular. Panel de la izquierda (superior): Secciones transversales de retinas de un ojo inyectado con vehículo y un ojo inyectado con CS con o sin

pulsos de isquemia. H&E. Nótese la disminución de células en la CCG en los ojos inyectados con CS sin pulsos. La aplicación de pulsos de isquemia preservó este parámetro. Las distintas capas de las retina mostraron una apariencia similar en todos los grupos experimentales. Panel de la izquierda (inferior): detección inmunohistoquímica de células NeuN positivas en la CCG de un ojo inyectado con vehículo o con CS con o sin pulsos de isquemia. Se observó una intensa inmunomarcación para NeuN (rojo) en la CCG. El número de CGR positivas para NeuN fue menor en los ojos hipertensos sin pulsos de isquemia que en los ojos inyectados con vehículo, mientras que la aplicación de pulsos de isquemia en los ojos hipertensos preservó este parámetro. Resultados similares se observaron en cuanto al número de núcleos marcados con DAPI (azul) en la CCG. Panel de la derecha: recuento de células en la CCG evaluada por tinción con H&E, inmunomarcados con NeuN y DAPI. Por todos estos métodos, se observó una disminución significativa del número de células en la CCG en ojos inyectados con CS sin pulsos de isquemia en comparación con los ojos inyectados con vehículo, mientras que los pulsos de isquemia en ojos hipertensos preservaron estos parámetros. Se representan las medias ± EE (n = 5 animales por grupo). *p< 0,05, **p< 0,01 vs. ojos inyectados con vehículo sin pulsos de isquemia (sham), a: p< 0,05, b: p< 0,01 vs. ojos inyectados con CS sin pulsos de isquemia (sham), test de Tukey.

Análogamente, la hipertensión ocular inducida por CS provocó una disminución significativa en el número de células positivas para Thy-1 (marcador específico de CGR), mientras que la aplicación de pulsos de 5 min de isquemia en ojos hipertensos preservó significativamente este parámetro (Figura 43). Posteriormente se evaluó la apoptosis retiniana utilizando el método de TUNEL (deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling). Se observó un aumento significativo en el número de células $TUNEL^+$ en la CCG en retinas de ojos inyectados con CS y sometidos a un procedimiento simulado, mientras que la aplicación de pulsos de isquemia disminuyó significativamente el número de células apoptóticas (Figura 43). No se observaron células $TUNEL^+$ en las retinas de los ojos inyectados con vehículo y sometidos a pulsos de isquemia o procedimiento simulado (datos no mostrados).

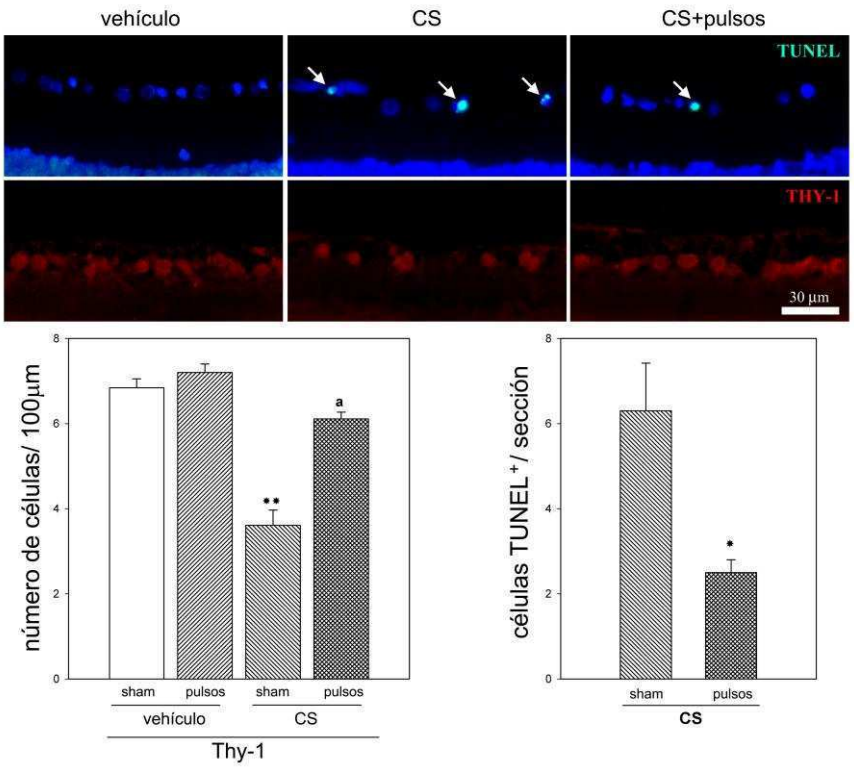

Figura 43. Análisis de apoptosis por la técnica de TUNEL (panel superior) y niveles de Thy-1 (panel central) a las 10 semanas de hipertensión ocular. Panel superior: El número de células TUNEL$^+$ (flecha) en la CCG fue significativamente mayor en los ojos hipertensos sometidos a un procedimiento simulado que en aquellos sometidos a pulsos de isquemia. No se observaron células TUNEL$^+$ en los ojos inyectados con vehículo sometidos a pulsos de isquemia o procedimiento simulado (no mostrado). Los núcleos celulares fueron marcados con DAPI. Panel central: El número de células positivas para Thy-1 fue significativamente menor en los ojos hipertensos sin pulsos de isquemia que en los ojos inyectados con vehículo, mientras que la aplicación de pulsos de isquemia en los ojos hipertensos evitó la disminución en el número de células positivas para Thy-1. Se representan las medias ± EE (n = 5 ojos por grupo). Para el análisis de TUNEL: *p< 0,05 vs. ojos inyectados con CS sin pulsos de isquemia (sham), test de Student; para el análisis de Thy-1: **p< 0,01 vs. ojos inyectados con vehículo sin pulsos de isquemia (sham), a: p< 0,01, vs. ojos inyectados con CS sin pulsos de isquemia (sham), test de Tukey.

A continuación, se examinó el efecto de la aplicación de pulsos de isquemia sobre la arquitectura de los nervios ópticos de ojos inyectados con vehículo o CS durante 10 semanas. Como se muestra en la Figura 44 el efecto de la hipertensión ocular sobre los axones del nervio óptico fue similar al descripto en la Figura 38. La aplicación de pulsos de isquemia disminuyó significativamente la pérdida de axones con un diámetro comprendido entre 0,2 y 0,6 µm

inducida por hipertensión ocular crónica. No se observaron diferencias significativas en el número de axones con diámetro comprendido entre 0,05 y 0,2 μm entre los distintos grupos experimentales (es decir, vehículo + proc. simulado = 572 ± 31, vehículo + pulsos = 583 ± 42, CS + proc. simulado = 569 ± 38 y CS + pulsos = 598 ± 45 número de axones), ni en el área transversal de los nervios ópticos entre los animales inyectados con vehículo o CS, con o sin pulsos de isquemia (es decir, área transversal del nervio óptico: 0,217 ± 0,01; 0,213 ± 0,02; 0,217 ± 0,02 y 0,216 ± 0,01 mm^2, para animales con vehículo + sham, vehículo + pulsos, CS + sham y CS + pulsos, respectivamente).

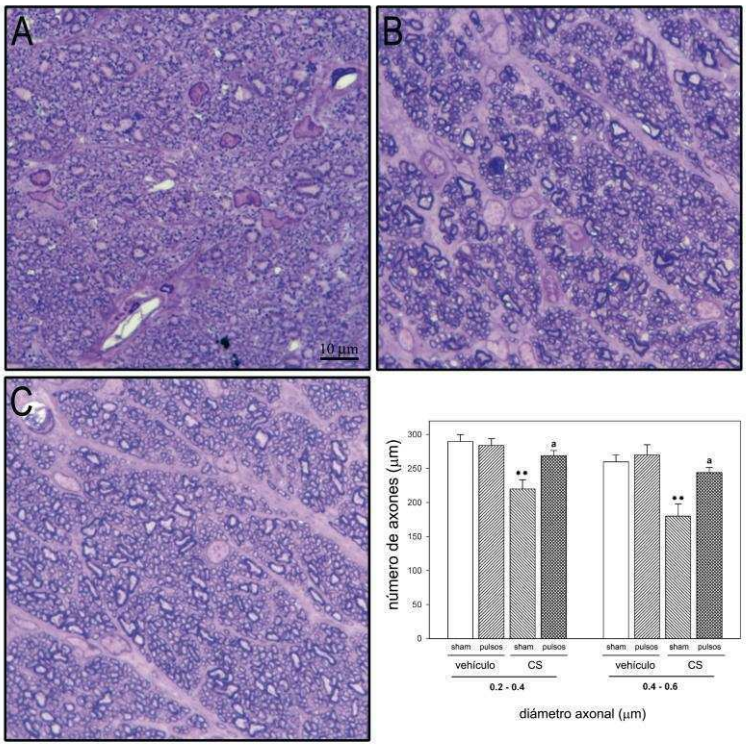

Figura 44. Secciones transversales del nervio óptico de un ojo control y de un ojo hipertenso con o sin pulsos de isquemia. (A) Nervio óptico intacto y sano. Nótese la homogeneidad de la tinción. En los ojos inyectados con CS sin pulsos de isquemia (B) se observó una menor tinción de axones, en tanto que en los ojos tratados con CS más pulsos de isquemia (C) se observó una estructura conservada del nervio óptico. Tinción con azul de toluidina. (D) Cuantificación de axones en el nervio óptico de ojos inyectados con vehículo o CS con o sin pulsos de isquemia. Se observó una disminución significativa en el número de axones en los ojos hipertensos sin pulsos de isquemia, en comparación con los ojos inyectados con vehículo (sham), mientras que la aplicación

de pulsos de isquemia preservó significativamente este parámetro. Se representan las medias ± EE (n = 5 ojos / grupo). *p< 0,05 vs. ojos inyectados con vehículo sin pulsos de isquemia (sham), a: p< 0,05 vs. ojos inyectados con CS sin pulsos de isquemia (sham), test de Tukey.

Por último, con el fin de analizar la participación de estrés oxidativo en la protección inducida por los pulsos de isquemia, se examinó la peroxidación lipídica retiniana. En los ojos con inyecciones crónicas de CS sometidos a un procedimiento simulado se observó un aumento significativo en los niveles de TBARS, mientras que la aplicación semanal de pulsos de isquemia disminuyó significativamente este parámetro, como se muestra en la Figura 45.

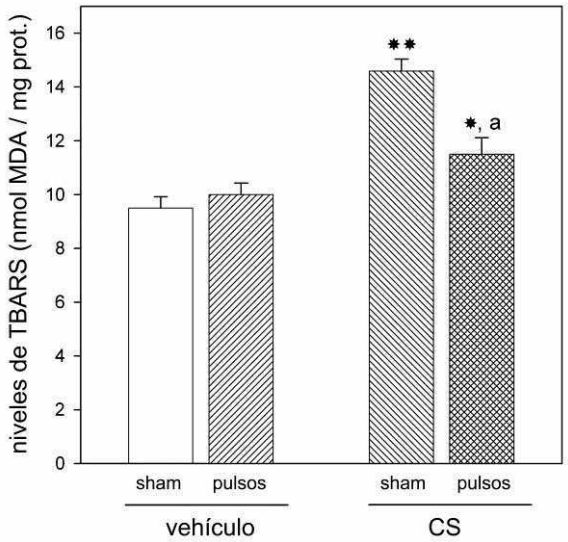

Figura 45. Niveles retinianos de TBARS en animales inyectados con vehículo o CS, sin o con pulsos de isquemia. Este parámetro fue significativamente mayor en los ojos inyectados con CS sin pulsos de isquemia que en aquellos inyectados con vehículo. La aplicación de pulsos de isquemia en ojos hipertensos redujo significativamente el aumento en los niveles retinianos de TBARS. Se representa la media ± EE (n = 12 ojos / grupo), *p< 0,05, **p< 0,01 vs. ojos inyectados con vehículo sin pulsos de isquemia (sham), a: p< 0,05 vs. ojos inyectados con CS sin pulsos de isquemia (sham), test de Tukey.

En suma, estos resultados indican que la inducción de tolerancia isquémica podría constituir una nueva estrategia terapéutica para el tratamiento del glaucoma.

5. Estudio de las consecuencias funcionales e histológicos tempranas de la neurotomía óptica radial (NOR) en ojos de rata normal

Como se mencionó en la Introducción, la NOR es una estrategia quirúrgica desarrollada como recurso terapéutico para el tratamiento de la oclusión de la vena central de la retina (OVCR). Existen aún controversias sobre los beneficios de esta cirugía para el tratamiento de esta

enfermedad, y sobre todo, es materia de activa discusión la incidencia de posibles efectos adversos de este procedimiento. No se disponía de ningún antecedente sobre los eventuales efectos adversos de este procedimiento quirúrgico en ratas sanas (sin OVCR). En una primera etapa, se evaluó la cabeza del nervio óptico en ojos con NOR luego de 1, 3 ó 7 días post-cirugía. Un día después de la NOR, se observó un pequeño daño y edema en la cabeza del nervio óptico. Esta herida alcanzó la placa cribiforme, sin dañar la esclera adyacente o los vasos retinianos (Figura 46, A y D). Tanto la vena como la arteria central de la retina permanecieron inalteradas luego de la NOR, mientras que la capa de fibras se interrumpió mínimamente. El globo ocular no fue alterado en ninguno de los ojos operados y solamente se observó la presencia de un número reducido de eritrocitos extravasados en la retina. A los 3 días después de la NOR, la herida abierta fue reemplazada y agrandada por una cicatriz celular (Figura 46, B y E). No se observó neovascularización en los ojos operados ni daño en los vasos adyacentes. Se observaron cambios mínimos en un corte seriado del nervio óptico luego de 7 días post-cirugía y cierto grado de irregularidad en los haces de las fibras nerviosas en el sitio de la NOR (Figura 46, C y F).

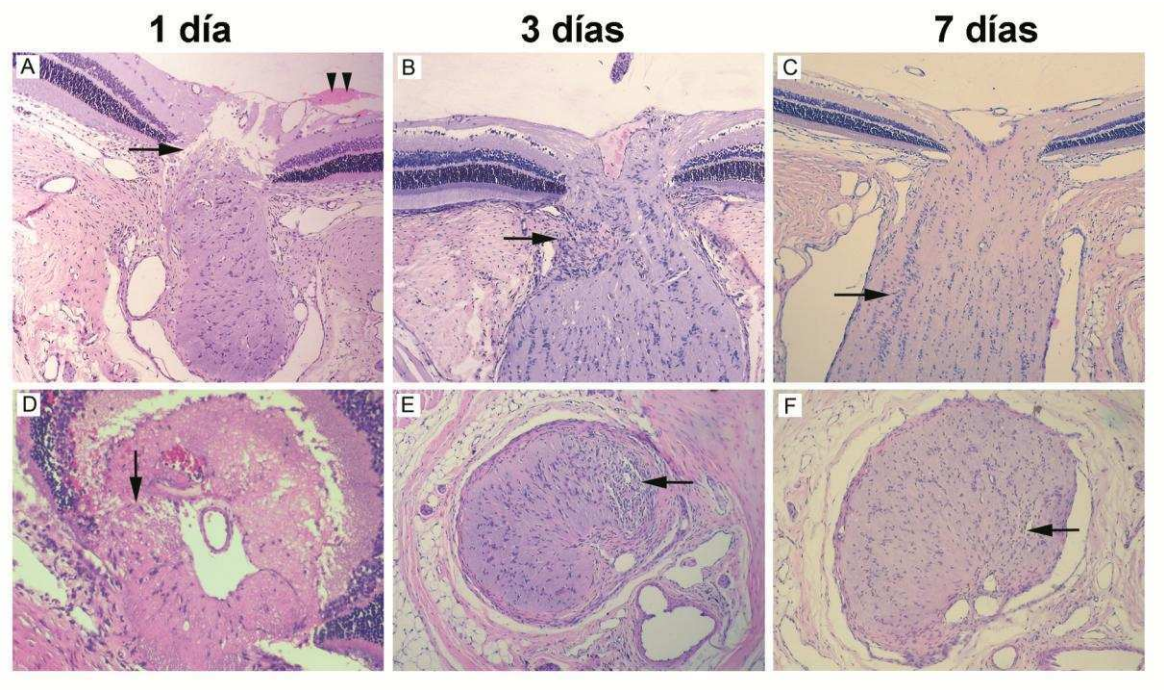

Figura 46. Imágenes histológicas de cortes transversales y longitudinales del nervio óptico a 1

(A y D), 3 (B y E), y 7 (C y F) días después de la NOR (H&E). A: Incisión de la NOR (flecha) y hemorragias focales en el borde del disco óptico (puntas de flecha).B: cicatriz celular en el sitio de la incisión en el nervio óptico (flecha). C: leve irregularidad de los haces de fibras nerviosas y gliosis en el nervio óptico (flecha). D: edema en el nervio óptico y eritrocitos extravasados en la retina adyacente (flecha). E: área circunscripta de gliosis en el nervio óptico. F: no se observaron alteraciones evidentes en el día 7 post-cirugía operación. Se observan haces de fibras nerviosas empaquetadas en forma estrecha en el lugar de la incisión (flecha).

Luego, se evaluó el efecto de la NOR sobre la función retiniana y se registraron ERGs a diferentes intervalos post-cirugía. La Figura 47 muestra ERGs escotópicos de ojos con operación simulada o NOR luego de 1, 3 ó 7 días post-cirugía. Un día después de la cirugía, se observó una disminución leve pero significativa en la amplitud de las ondas a y b del ERG, aunque no se observaron diferencias significativas en estos parámetros entre los ojos con operación simulada y operados con NOR luego de 3 y 7 días post-cirugía. No se observaron diferencias significativas en la latencia de las ondas a y b del ERG entre los distintos grupos experimentales en ninguno de los intervalos examinados.

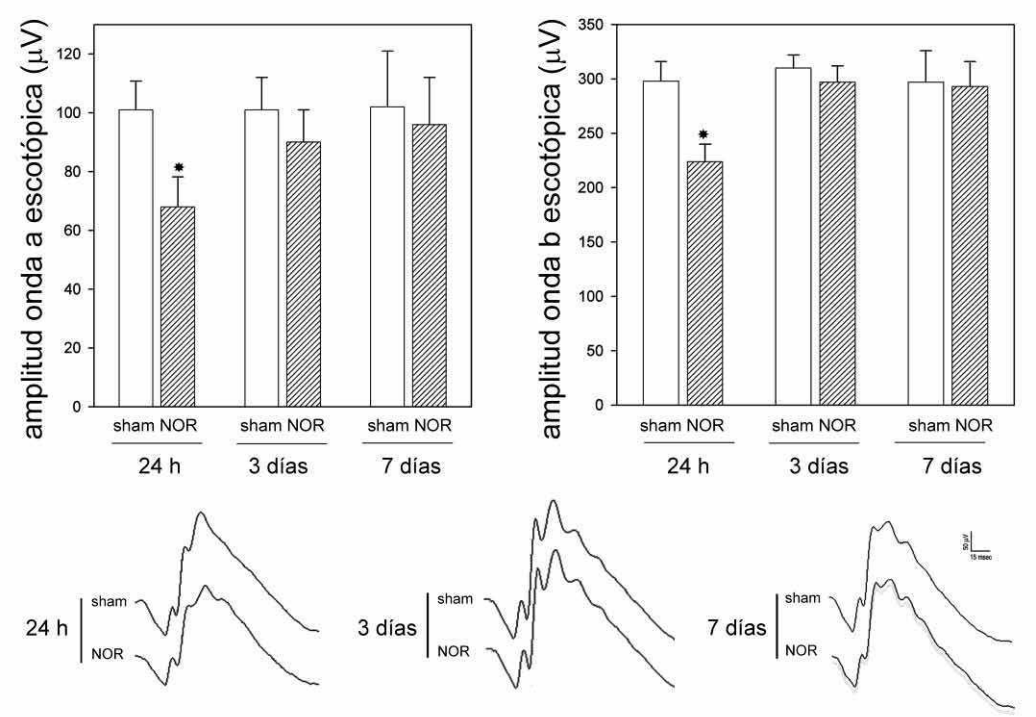

Figura 47. ERGs escotópicos de ojos sometidos a NOR o procedimiento simulado (sham) a diversos intervalos post-cirugía. En el panel superior se representan las amplitudes promedio de las ondas a y b del ERG escotópico. Se observó una disminución significativa en la amplitud de las ondas a y b del ERG en los ojos

sometidos a NOR a las 24 h, pero no se detectaron diferencias en estos parámetros a los 3 ó 7 días post-NOR. Se representan las medias ± EE (n = 10 ojos / grupo), *p< 0,05 vs. ojos con operación simulada, test de Student. Panel inferior: se muestran registros representativos del ERG de los distintos grupos experimentales

Luego, se evaluó el efecto de la NOR sobre la función de la vía visual a través del registro de VEPs en animales sometidos a la cirugía o un procedimiento simulado a los 7 días de la operación. No se observaron diferencias significativas en los VEPs entre los distintos grupos experimentales (Figura 48).

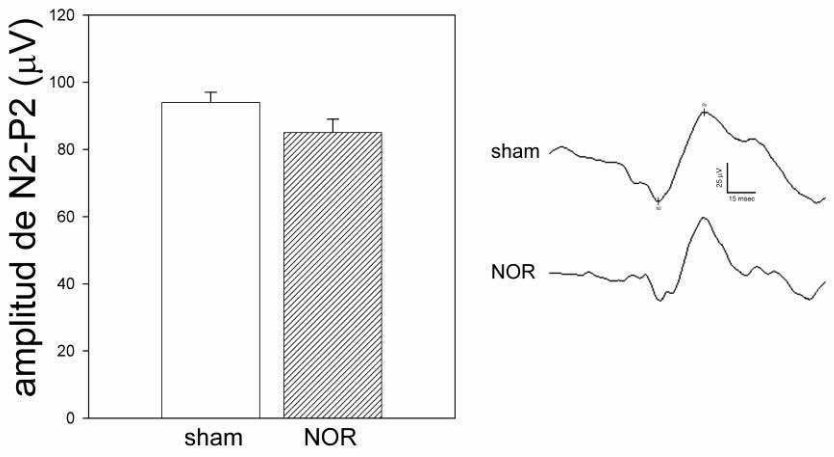

Figura 48. VEPs en ojos de ratas sometidos a NOR o procedimiento simulado. En el panel izquierdo se representan las amplitudes promedio del componente N2-P2 del VEP. No se observaron diferencias significativas en los VEPs entre los grupos experimentales. Se representan las medias ± EE (n = 10 ojos / grupo). Panel de la derecha: se muestra VEPs representativos de los distintos grupos.

Asimismo, se evaluó el reflejo pupilar a los 7 días post-cirugía (Figura 49). No se observaron diferencias significativas cuando el ojo tratado con operación simulada o NOR fue estimulado por un pulso de luz y se registró la contracción pupilar en el ojo contralateral (intacto). Un resultado similar se obtuvo cuando se aplicó un pulso de luz en el ojo intacto y se evaluó la contracción pupilar en el ojo con NOR u operación simulada. El reflejo pupilar consensual en ojos con operación simulada fue indistinguible del registrado en ojos intactos (datos no mostrados).

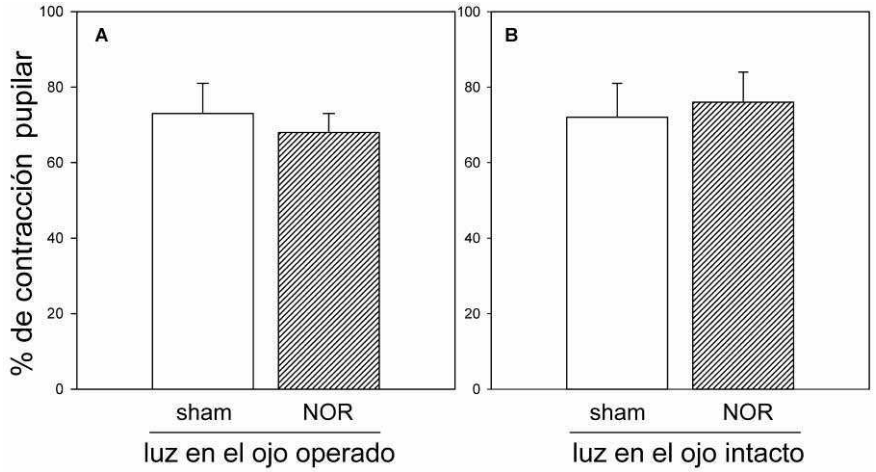

Figura 49. Evaluación del reflejo pupilar consensual en ojos sometidos a NOR u operación simulada. El diámetro de la pupila en relación con el diámetro del limbo fue medido antes y después de un estímulo fótico y el porcentaje de contracción de la pupila se calculó como la fracción del área de la pupila de la contracción máxima respecto al área de la pupila en la dilatación máxima (es decir, 2 s antes del estímulo lumínico). Panel izquierdo: El pulso de luz se aplicó en el ojo sometido a NOR u operación simulada y se registró en el ojo contralateral intacto. La máxima contracción de la pupila no difirió entre los grupos. Panel de la derecha: el estímulo se aplicó en los ojos intactos y la contracción pupilar se registró en el ojo contralateral operado. No se observaron diferencias significativas entre los grupos. Se representan las medias ± EE (n = 6 ojos/grupo)

No se observaron diferencias significativas en la PIO entre los ojos con NOR y aquellos sometidos a una operación simulada luego de 7 días post- cirugía (Figura 50).

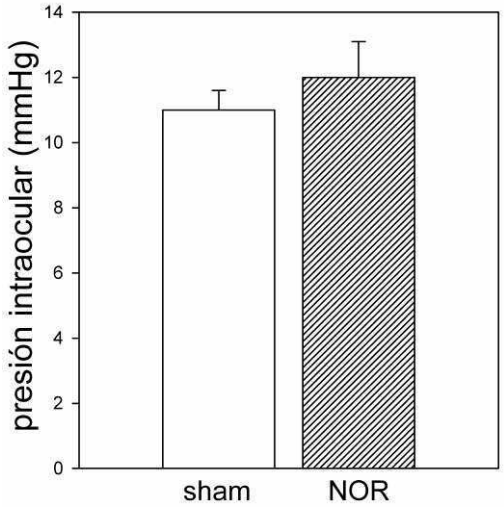

Figura 50. Determinación de la PIO en ojos sometidos a NOR u operación simulada a los 7 días post-cirugía. No se observaron diferencias significativas en este parámetro entre los grupos experimentales. Se representan las medias (n = 10 ojos/grupo).

Estos resultados indican que en ratas normales, la NOR sólo provocó efectos adversos menores, tanto a nivel funcional como histológico.

6. Neurotomía óptica radial: efecto preventivo y terapéutico en la neuropatía glaucomatosa

Como ya se mencionó y considerando que la NOR es un procedimiento mayoritariamente inocuo per se en ratas sanas, se analizaron los posibles beneficios terapéuticos de esta cirugía en el modelo experimental de glaucoma inducido por inyecciones semanales de CS en la cámara anterior. En una primera etapa, se realizó la NOR a las 3 semanas de hipertensión ocular (inducida por inyecciones bilaterales semanales de CS) en un ojo de cada animal y en el ojo contralateral se realizó una operación simulada. No se observaron diferencias significativas en la PIO luego de 10 semanas de tratamiento con CS entre los ojos sometidos a una operación simulada o NOR. Resultados similares se obtuvieron en el grupo de animales tratados con vehículo (Figura 51).

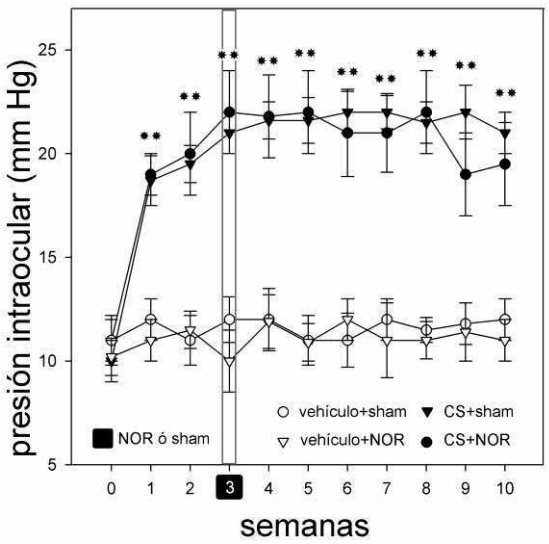

Figura 51. Determinación de la PIO en ojos sometidos a NOR u operación simulada a las 3 semanas de tratamiento en ojos inyectados bilateralmente con vehículo o CS. Se evaluó la PIO una vez por semana hasta la 10ma semana. En todos los intervalos estudiados, el CS aumentó significativamente la PIO en comparación con los ojos inyectados con vehículo. La NOR no modificó este parámetro en los ojos inyectados con vehículo o CS. Se representan las medias ± EE (n = 10 animales por grupo). **p< 0,01 vs. ojos inyectados con vehículo con operación simulada (sham), test de Tukey.

A continuación, se evaluó el efecto de la NOR sobre la función retiniana, luego de 10 semanas de tratamiento con vehículo o CS. Se observó una disminución significativa en la amplitud de las

ondas a y b del ERG en animales con hipertensión ocular luego de 10 semanas de tratamiento con CS en ojos con operación simulada. Esta caída fue parcialmente prevenida en los ojos inyectados con CS y sometidos a NOR (Figura 52).

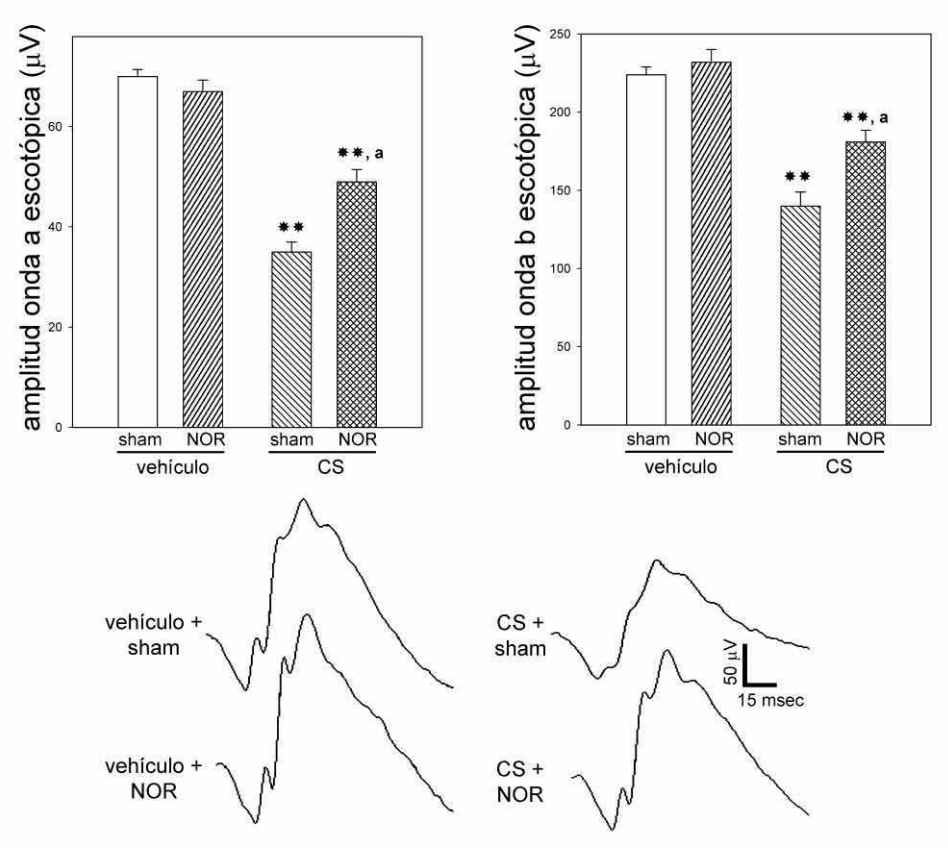

Figura 52. Preservación electrorretinográfica inducida por NOR en ojos hipertensos. Se registraron ERGs a las 10 semanas de tratamiento con vehículo o CS. En ojos sometidos a una operación simulada, el CS indujo una disminución significativa en la amplitud de la onda a y b del ERG en comparación con los ojos inyectados con vehículo. En los ojos hipertensos sometidos a NOR realizada a las 3 semanas de tratamiento con CS, se observó una preservación significativa de estos parámetros. Se representan las medias ± EE (n = 10 animales por grupo); **p< 0,01 vs. ojos inyectados con vehículo con operación simulada, a: p< 0,05 vs. ojos inyectados con CS y sometidos a una operación simulada (sham), test de Tukey. Panel inferior: se muestran ERGs representativos de los distintos grupos experimentales

Asimismo, se observó una disminución significativa en la amplitud del componente N2-P2 del VEP en los animales con hipertensión ocular (sham). En ojos inyectados con CS la NOR previno significativamente la caída de este parámetro (Figura 53). No se observaron cambios

significativos en la latencia de la amplitud del componente N2-P2 del VEP entre los distintos grupos experimentales.

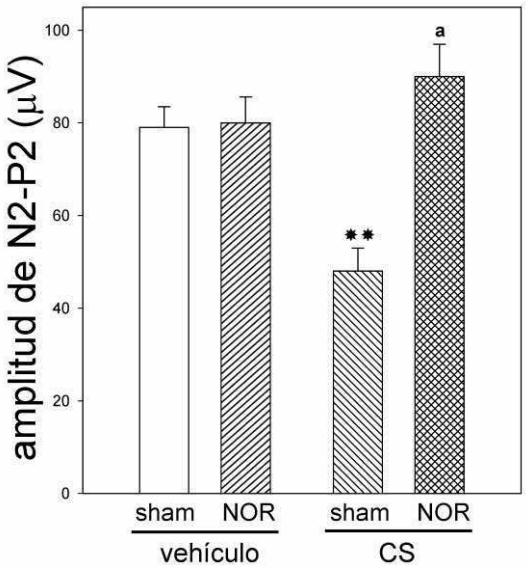

Figura 53. VEPs en ojos de ratas sometidos a NOR o un procedimiento simulado a las 3 semanas de tratamiento con vehículo o CS. Se representan las amplitudes del componente N2-P2 del VEP. En los animales con CS más operación simulada se observó una disminución significativa de este parámetro con respecto a los animales inyectados con vehículo más sham. Esta caída fue totalmente prevenida por la NOR. Se representan las medias ± EE (n = 10 ojos / grupo). **p< 0,01 vs. ojos inyectados con vehículo más operación simulada (sham), a: p< 0,01 vs. ojos inyectados con CS más sham, test de Tukey.

Luego, se examinó el efecto de la NOR sobre las alteraciones histológicas inducidas por las inyecciones crónicas de CS. Se observó una reducción significativa en el número de células en la CCG en los ojos tratados con CS y sometidos a una operación simulada en secciones transversales de retinas teñidas con H&E, en tanto que la NOR a las 3 semanas de tratamiento, previno la caída en el número de células de la CCG (Figura 54). No se observaron alteraciones en el espesor total de la retina y de cada una de sus capas en ninguno de los grupos experimentales (datos no mostrados). En la Figura 54, se observa la inmunorreactividad para Thy-1, NeuN y Brn3a en retinas de ojos inyectados con vehículo o CS, con o sin NOR. Se observó una disminución significativa en los niveles de estos tres marcadores en ojos hipertensos con operación simulada, en tanto que la NOR previno esta caída (Figura 54). La cuantificación de estos resultados se muestra en la Tabla IV.

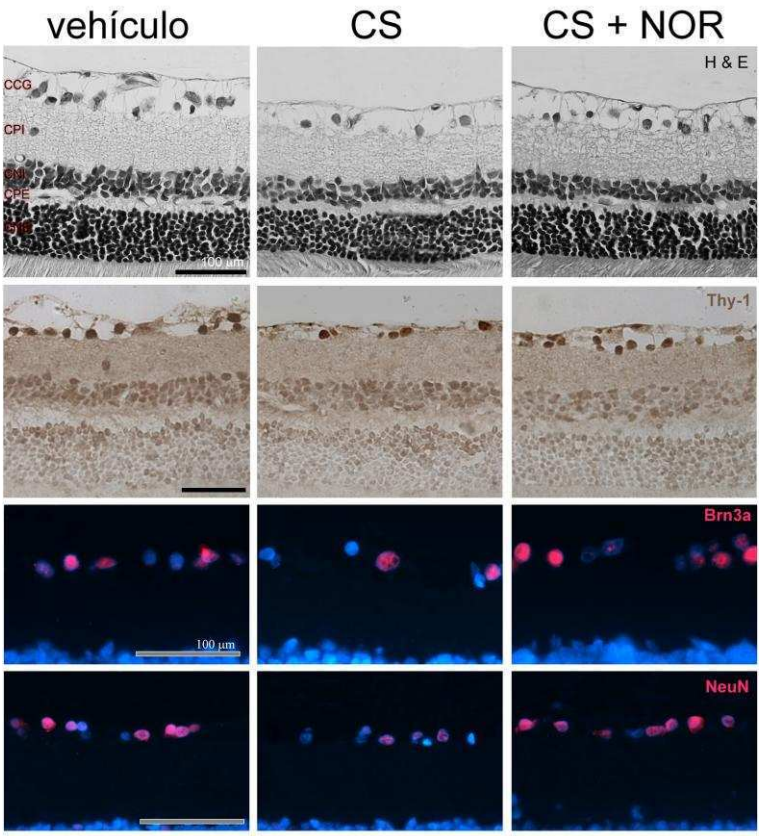

Figura 54. Histología de la retina a las 10 semanas de hipertensión ocular. Secciones transversales de retinas teñidas con H&E, o inmunomarcadas con anticuerpos específicos anti- Thy-1, NeuN y Brn3a en ojos inyectados con vehículo y sometidos a una operación simulada y en ojos hipertensos con o sin NOR realizada a las 3 semanas de tratamiento. En las retinas teñidas con H&E se observó una disminución significativa en el número de células en la CCG en el grupo de animales con CS, que fue prevenida por la NOR. La presencia de Thy-1, NeuN y Brn3a se restringió a la CCG en todos los grupos. La hipertensión ocular provocó una disminución significativa en los niveles de estos marcadores, que fue prevenida por la NOR

Tabla IV. Efecto de la NOR a las 3 semanas en ojos inyectados con vehículo o CS

	Número de células/100 µm			
	vehículo		CS	
	sham	NOR	sham	NOR
H&E	9,7 ± 0.7	9,0 ± 0.6	6,1 ± 0,7 **	9,9 ± 0,3 ††
DAPI	6,0 ± 0,1	5,8 ± 0,1	3,8 ± 0,2 **	5,8 ± 0,3 ††
Thy-1	4,1 ± 0,1	4,0 ± 0,2	2,1 ± 0,1 **	4,2 ± 0,1 ††
NeuN	4,6 ± 0,5	4,2 ± 0,4	1,8 ± 0,4 **	3,5 ± 0,1 †
Brn3a	3,1 ± 0,1	2,9 ± 0,2	1,7 ± 0.1 **	3,0 ± 0.2 ††

Cuantificación de secciones transversales de retinas de ojos inyectados con vehículo o CS con o sin NOR realizada a las 3 semanas de tratamiento. Se observó que tanto el número de células localizadas en la CCG y teñidas con H&E, como aquellas inmunorreactivas para Thy-1, NeuN y Brn3a disminuyó significativamente en ojos hipertensos con operación simulada, en tanto que la NOR previno significativamente esta disminución. Se representan las medias ± EE (n = 5 ojos/grupo) **p< 0,01 vs. ojos con vehículo más operación simulada; †: p< 0,05, ††: p< 0,01 vs. ojos con CS más operación simulada, test de Tukey.

A continuación, se evaluó la arquitectura del nervio óptico de ojos correspondientes a los distintos grupos experimentales. Las alteraciones en esta estructura observadas en ojos con hipertensión ocular sometidos a una operación simulada fueron esencialmente similares a las descriptas anteriormente en ojos inyectados semanalmente con CS durante 10 semanas sin

operación (ver Figura 38 y 44). En el grupo de animales con CS más NOR se observó una preservación de la estructura del nervio óptico (Figura 55).

En conjunto, estos resultados indican que la NOR previno las alteraciones histológicas y funcionales inducidas por hipertensión ocular crónica.

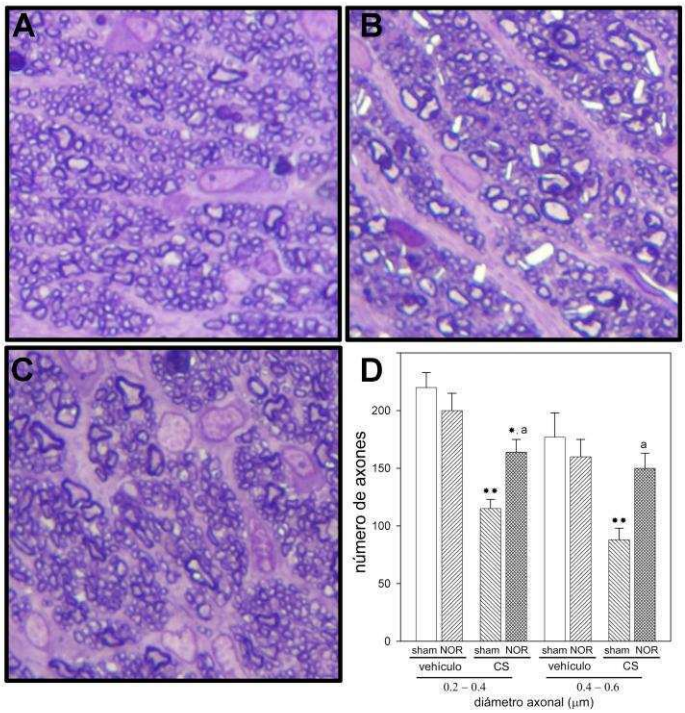

Figura 55. Secciones transversales del nervio óptico de un ojo control y de un ojo hipertenso con o sin NOR. (A) Nervio óptico intacto y sano. (B) Nervio óptico de un ojo inyectado con CS y sometido a una operación simulada: se observa una menor área de tinción que indica una alteración en el nervio. Por el contrario, se observó una estructura conservada del nervio óptico en los ojos tratados con CS y sometidos a NOR (C). Tinción con azul de toluidina. (D) Cuantificación de axones en los ojos inyectados con vehículo o CS con o sin NOR. Se observó una disminución significativa en el número de axones en los ojos hipertensos sometidos a una operación simulada, en comparación con los ojos inyectados con vehículo, en tanto que la NOR previno significativamente la caída de este parámetro. Se representan las medias ± EE (n = 5 ojos / grupo). *p< 0,05 vs. ojos inyectados con vehículo más operación simulada (sham), a: p< 0,05 vs. ojos inyectados con CS más sham, test de Tukey.

En la siguiente serie de experimentos se procedió a realizar la NOR a las 6 semanas de hipertensión ocular inducida por inyecciones semanales de CS. No se observaron diferencias significativas en la PIO entre todos los grupos experimentales (Figura 56).

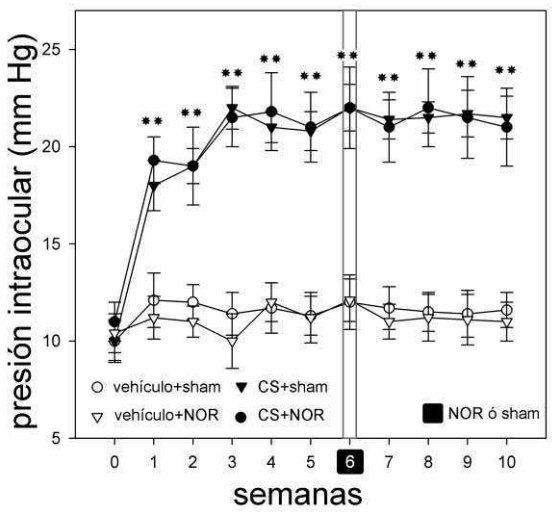

Figura 56. Determinación tonométrica de la PIO en ojos sometidos a NOR u operación simulada a las 6 semanas de tratamiento intracameral bilateral con vehículo o CS. Se evaluó la PIO una vez por semana hasta la 10ma semana. En todos los intervalos estudiados, el CS aumentó significativamente la PIO en comparación con los ojos inyectados con vehículo. La NOR no modificó este parámetro en los ojos inyectados con vehículo o CS. Se representan las medias ± EE (n = 10 animales por grupo). **p< 0,01 vs. ojos inyectados con vehículo con operación simulada (sham), test de Tukey.

Se observó una disminución significativa en la amplitud de las ondas a y b del ERG escotópico en animales con hipertensión ocular más operación simulada. Esta caída fue parcialmente revertida en ojos hipertensos sometidos a NOR (Figura 57).

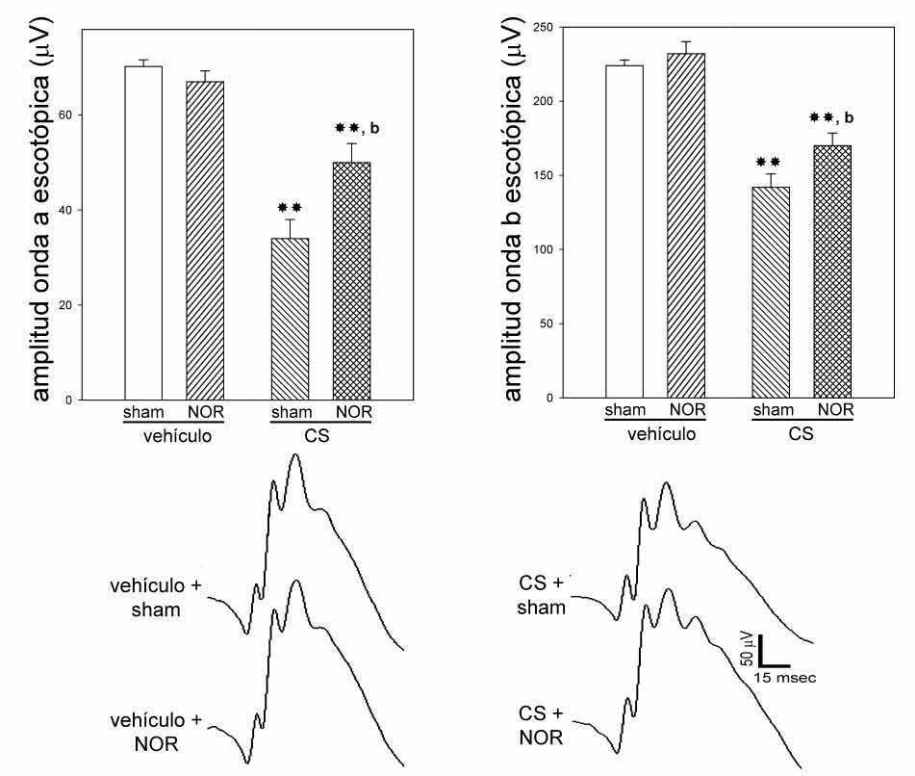

Figura 57. Efecto de la NOR realizada a las 6 semanas de tratamiento con CS sobre la caída en el ERG inducida por hipertensión ocular crónica. Se registraron ERGs después de 10 semanas de tratamiento con vehículo o CS. El CS indujo una disminución significativa en la amplitud de las ondas a y b del ERG en comparación con los ojos inyectados con vehículo. En los ojos hipertensos sometidos a NOR a las 6 semanas de tratamiento con CS, se observó una preservación significativa de estos parámetros. Se representan las medias ± EE (n = 10 animales/ grupo). **p< 0,01 vs. ojos inyectados con vehículo y sometidos a una operación simulada, b: p< 0,05 vs. ojos inyectados con CS sometidos a una operación simulada (sham), test de Tukey. Panel inferior: se muestran ERGs representativos de los distintos grupos experimentales.

Luego se registraron VEPs a las 10 semanas de tratamiento con vehículo o CS. Se observó una disminución significativa en la amplitud del componente N2-P2 del VEP en los animales con hipertensión ocular sometidos a una operación simulada (Figura 58). La NOR revirtió completamente la caída de este parámetro en ojos crónicamente hipertensos. No se observaron cambios significativos en la latencia del componente N2-P2 del VEP entre los distintos grupos experimentales. Los ERGs y VEPs de ojos con operación simulada realizada a las 3 ó 6 semanas de tratamiento con vehículo no difirieron de los obtenidos en ojos intactos (datos no mostrados).

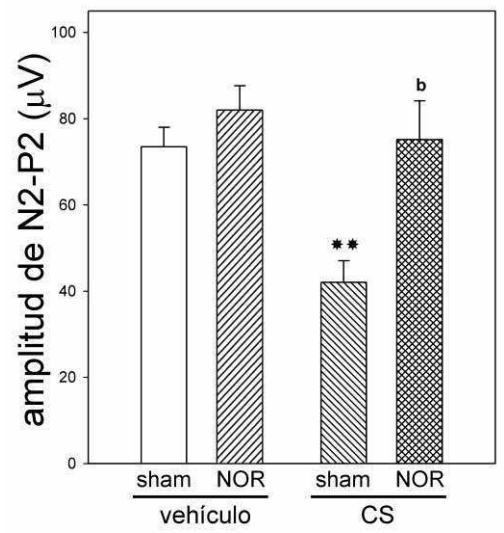

Figura 58. VEPs en ojos de sometidos a NOR o un procedimiento simulado a las 6 semanas de tratamiento con vehículo o CS. Se representan las amplitudes promedio del componente N2-P2 del VEP. En los ojos inyectados con CS y sometidos a una operación simulada se observó una disminución de este parámetro con respecto a los animales inyectados con vehículo más sham. Esta caída fue totalmente revertida por la NOR. Se representan las medias ± EE (n = 10 ojos / grupo). **p< 0,01 vs. ojos inyectados con vehículo más operación simulada (sham), b: p< 0,01 vs. ojos inyectados con CS más sham, test de Tukey.

Luego, se examinó el efecto de la NOR sobre las alteraciones histológicas inducidas por las inyecciones crónicas de CS. Se observó una reducción significativa en el número de células en la CCG en los ojos tratados con CS y sometidos a una operación simulada, en secciones transversales de retinas teñidas con H&E o inmunomarcadas con anticuerpos anti- Thy-1, anti-NeuN o anti-Brn3a, mientras que la NOR a las 6 semanas de tratamiento evitó significativamente esta caída (Figura 59). La cuantificación de estos resultados se muestra en la Tabla V.

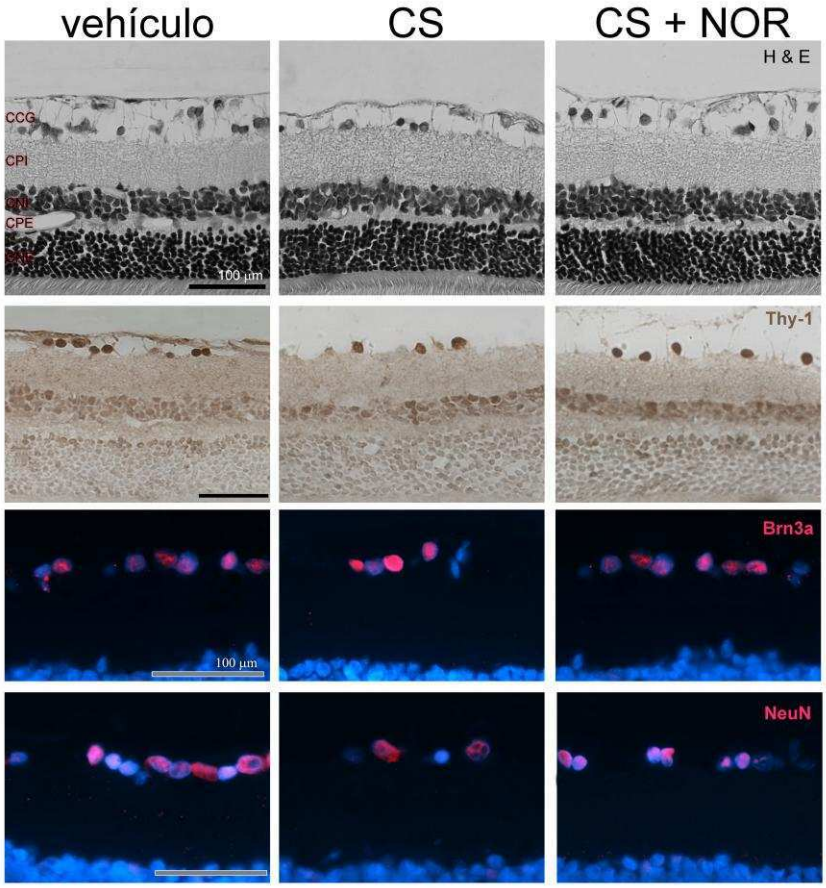

Figura 59. Histología de la retina a las 10 semanas de hipertensión ocular. Secciones transversales de retinas teñidas con H&E, o inmunomarcadas con anticuerpos específicos anti- Thy-1, NeuN y Brn3a en ojos inyectados con vehículo y sometidos a una operación simulada y en ojos hipertensos con o sin NOR realizada a las 6 semanas de tratamiento. En las retinas teñidas con H&E se observó una disminución significativa en el número de células en la CCG en el grupo de animales con CS, que no fue evidente en retinas de ojos sometidos a NOR. La presencia de Thy-1, NeuN y Brn3a se restringió a la CCG en todos los grupos. La hipertensión ocular provocó una disminución significativa en los niveles estos marcadores, que fue evitada por la NOR.

Tabla V. Efecto de la NOR a las 6 semanas en ojos inyectados con vehículo o CS.

	Número de células/100 µm			
	Vehículo		CS	
	sham	NOR	sham	NOR
H&E	9,5 ± 0,6	9,2 ± 0,5	5,0 ± 0,2 **	7,6 ± 0,3 *, ††
DAPI	6,2 ± 0,2	6,0 ± 0,3	3,4 ± 0,3 **	6,0 ± 0,1 ††
Thy-1	4,0 ± 0,3	3,8 ± 0,3	2,0 ± 0,2 **	3,4 ± 0,1 ††
NeuN	4,4 ± 0,4	4,5 ± 0,5	1,6 ± 0,3 **	3,2 ± 0,1 †
Brn3a	3,4 ± 0,2	3,1 ± 0,3	1,9 ± 0,2 **	3,0 ± 0,3 †

Cuantificación de secciones transversales de retinas de ojos inyectados con vehículo o CS con o sin NOR realizada a las 6 semanas de tratamiento. Se observó una disminución significativa en el número de células teñidas con H&E o inmunorreactivas para Thy-1, NeuN y Brn3a localizadas en la CCG, que fue revertida por la NOR. Se representan las medias ± EE (n=5 ojos/grupo) **p< 0,01 vs. ojos inyectados con vehículos más operación simulada; ††: p < 0,01, †: p< 0,05 vs. ojos inyectados con CS más operación simulada, test de Tukey.

También se evaluó la arquitectura del nervio óptico de los distintos grupos experimentales. El efecto de la hipertensión ocular sobre el nervio óptico fue similar al ya descripto. La NOR evitó significativamente las alteraciones de esta estructura en ojos hipertensos (Figura 60).

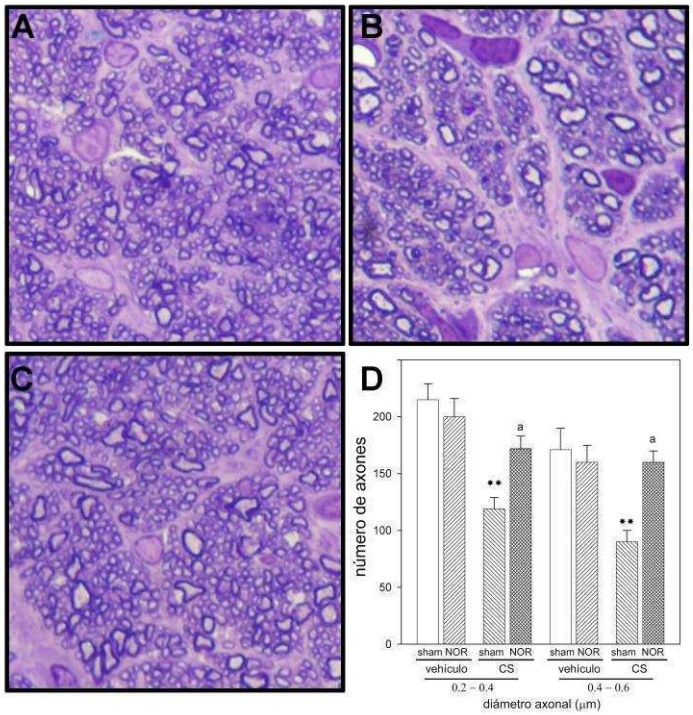

Figura 60. Secciones transversales del nervio óptico de un ojo control o de un ojo hipertenso con o sin NOR. (A) Nervio óptico intacto y sano. (B) Nervio óptico de un ojo inyectado con CS y sometido a una operación simulada. Se observó un área menor de tinción. (C) Nervio óptico de un ojo inyectado con CS y sometido a NOR: se observó, una estructura conservada del nervio óptico. Tinción con azul de toluidina. (D) Cuantificación de axones en los ojos inyectados con vehículo o CS con o sin NOR. Se observó una disminución significativa en el número de axones en los ojos hipertensos con operación simulada, en comparación con los ojos inyectados con vehículo, en tanto que la NOR preservó significativamente este parámetro. Se representan las medias ± EE (n = 5 ojos / grupo) *p< 0,05 vs. ojos inyectados con vehículo más operación simulada (sham), a: p< 0,05 vs. ojos inyectados con CS más sham, test de Tukey

Este conjunto de resultados demuestra que la NOR podría constituir una estrategia quirúrgica con beneficios terapéuticos frente al daño histológico y funcional retiniano provocado por el glaucoma experimental en ratas inducido por CS. Luego de demostrar los efectos preventivos y terapéuticos de la NOR en el modelo de glaucoma experimental inducido por CS, se analizaron los beneficios terapéuticos de la NOR en otro modelo de glaucoma experimental en ratas inducido por la cauterización de las venas epiesclerales. Para ello, en una primera serie de

experimentos se cauterizaron tres venas epiesclerales en forma bilateral y se realizó la NOR o un tratamiento simulado en un ojo de cada animal, 5 días antes de la cauterización y se evaluaron la función y la estructura retiniana a los 30 días post-cauterización. El grupo control consistió en la aplicación de la operación simulada o NOR en un ojo de cada animal, sin la correspondiente cauterización. Luego de 30 días post-cauterización se observó un aumento significativo en la PIO en los ojos cauterizados con o sin NOR (Figura 61). La NOR per se no tuvo efectos significativos sobre este parámetro.

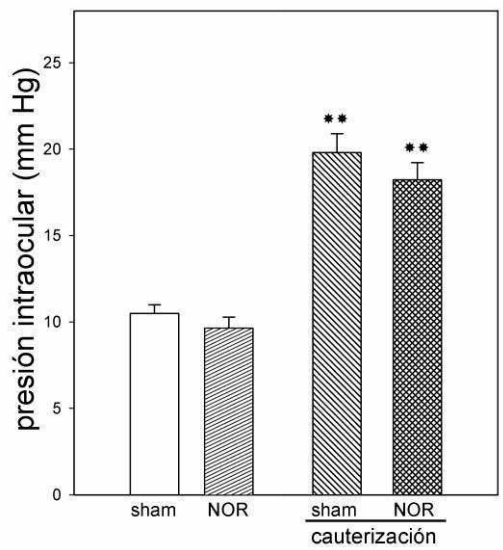

Figura 61. Determinación de la PIO en ojos control o con cauterización de 3 venas epiesclerales. Se realizó una operación simulada o NOR cinco días antes de la cauterización. Se evaluó la PIO a los 30 días post-cauterización. Se observó un aumento significativo en los ojos cauterizados con respecto a los ojos control. La NOR no modificó este parámetro. Se representan las medias ± EE (n = 5 animales/ grupo). **p< 0,01 vs. ojos control más operación simulada, test de Tukey.

Análogamente a lo descripto para el estudio de la NOR en el modelo de glaucoma inducido por CS, se analizaron la función de la retina y de la vía visual en ojos con hipertensión ocular inducida por la cauterización de las venas epilesclerales. También en este caso, se observó una caída significativa tanto en la amplitud de las ondas a como de la onda b del ERG en el grupo de animales cauterizados con operación simulada, en tanto que la NOR previno significativamente la caída de estos parámetros (Figura 62).

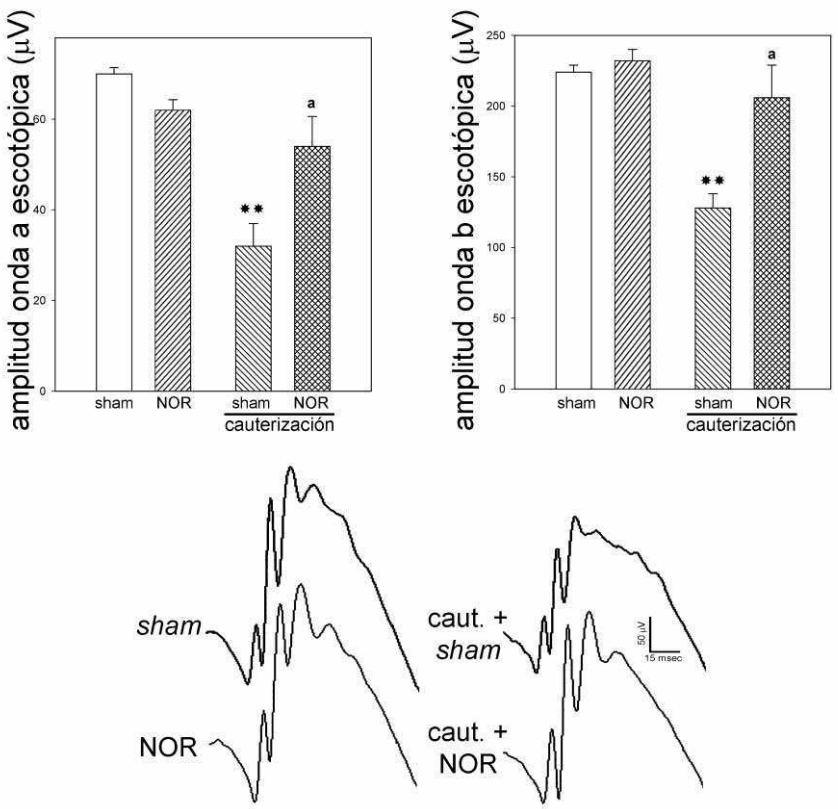

Figura 62. Preservación electrorretinográfica en ojos hipertensos sometidos a NOR. Se registraron ERGs a los 30 días de la cauterización. La hipertensión ocular indujo una disminución significativa en la amplitud de las ondas a y b del ERG, en comparación con los ojos control más operación simulada. En los ojos hipertensos sometidos a NOR 5 días antes de la cauterización, se observó una preservación significativa de estos parámetros. Se representan las medias ± EE (n = 10 animales /grupo); **p< 0,01 vs. ojos control más operación simulada, a: p< 0,01 vs. ojos cauterizados más operación simulada, test de Tukey. Panel inferior: se muestran ERGs representativos de los distintos grupos experimentales.

Asimismo, se observó una caída significativa en la amplitud del componente N2-P2 del VEP en los animales con cauterización más operación simulada luego de 30 días de hipertensión ocular, en tanto que la NOR previno totalmente la caída en la amplitud de los VEPs (Figura 63).

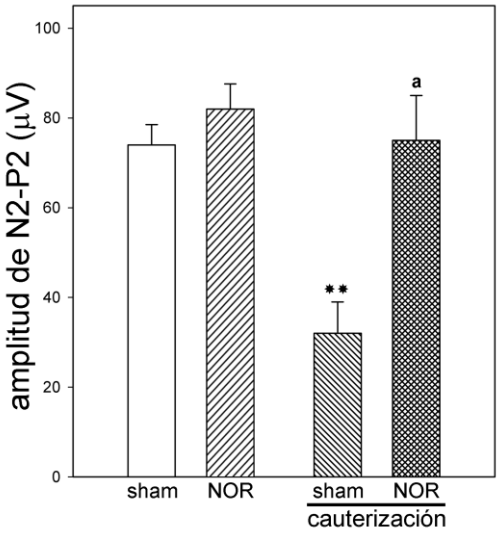

Figura 63. VEPs en ojos control o cauterizados con o sin NOR. Se registraron VEPs a los 30 días post-cauterización. Se representan las amplitudes promedio del componente N2-P2 del VEPs. Se observó una reducción significativa de este parámetro en los ojos cauterizados más sham; la NOR previno esta caída. Se representan las medias ± EE (n = 10 ojos / grupo), **p< 0,01 vs. ojos control más operación simulada, a: p< 0,01 vs. ojos cauterizados más operación simulada (sham), test de Tukey.

En animales con cauterización más operación simulada, se observó una disminución significativa en el número de células en la CCG que fue totalmente prevenida por la NOR (Figura 64).

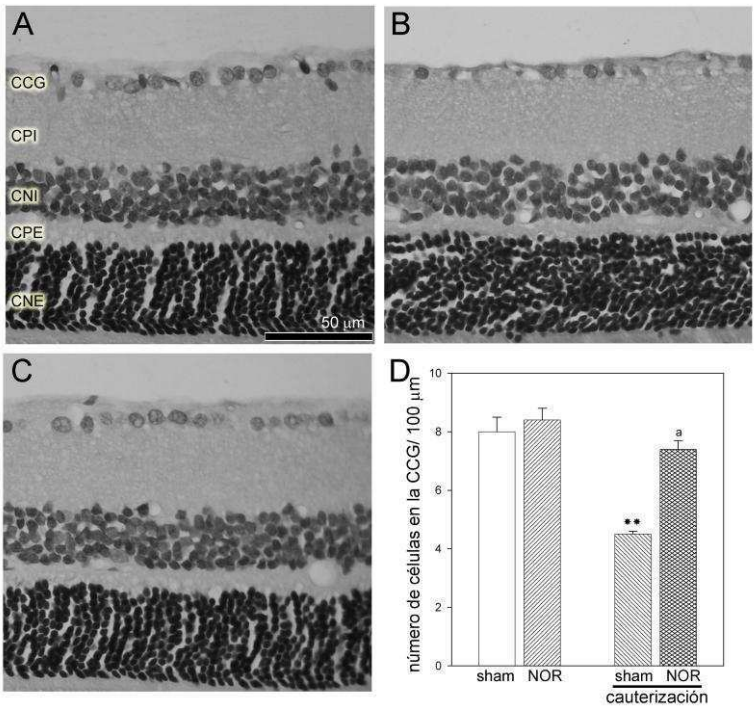

Figura 64. Efecto de la NOR sobre la pérdida de células en la CCG inducida por la hipertensión ocular crónica. La NOR se realizó 5 días antes del inicio de la hipertensión ocular. A los 30 días del tratamiento, se observó una disminución significativa en el número de células en la CCG en los animales cauterizados y sometidos a una operación simulada (B), en comparación con los ojos control más sham (A). La NOR (C) previno significativamente el efecto de la hipertensión ocular crónica. (D): Cuantificación de células en la CCG/100 µm ± EE (n = 5 animales/grupo). **p< 0,01 vs. ojos control más operación simulada, a: p< 0,01 vs. ojos cauterizados más operación simulada (sham), test de Tukey.

La eficacia terapéutica de la NOR fue evaluada en el modelo de glaucoma inducido por cauterización de las venas epiesclerales en forma análoga a lo ya descripto. Para ello, se realizó la NOR o una operación simulada en un ojo de cada animal 5 días después de la cauterización y se evaluó la PIO, la función retiniana y de la vía visual, así como la estructura de la retina y el nervio óptico. También en este caso, la NOR o el tratamiento simulado no modificaron la PIO en los animales con cauterización de las venas epiesclerales o en los controles (Figura 65).

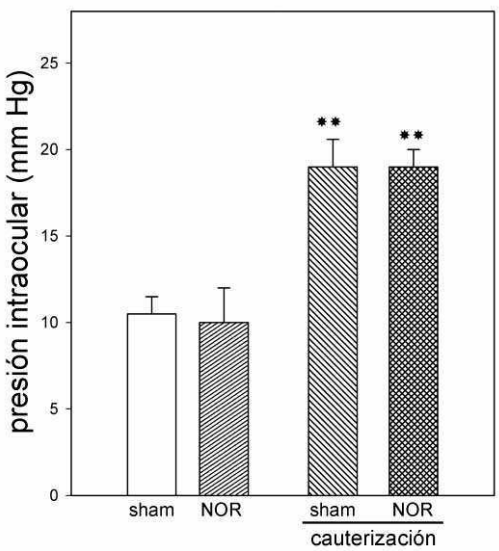

Figura 65. Se realizó una operación simulada o NOR cinco días después de la cauterización de 3 venas epiesclerales. Se evaluó la PIO a los 30 días post- cauterización. Se observó un aumento significativo en los ojos cauterizados con respecto a los ojos control. La NOR no modificó este parámetro. Se representan las medias ± EE (n = 5 animales/ grupo). **p <0,01 vs. ojos control más operación simulada, test de Tukey.

La caída en la amplitud de las ondas a y b del ERG en animales cauterizados con operación simulada, fue parcialmente revertida en ojos sometidos a NOR (Figura 66).

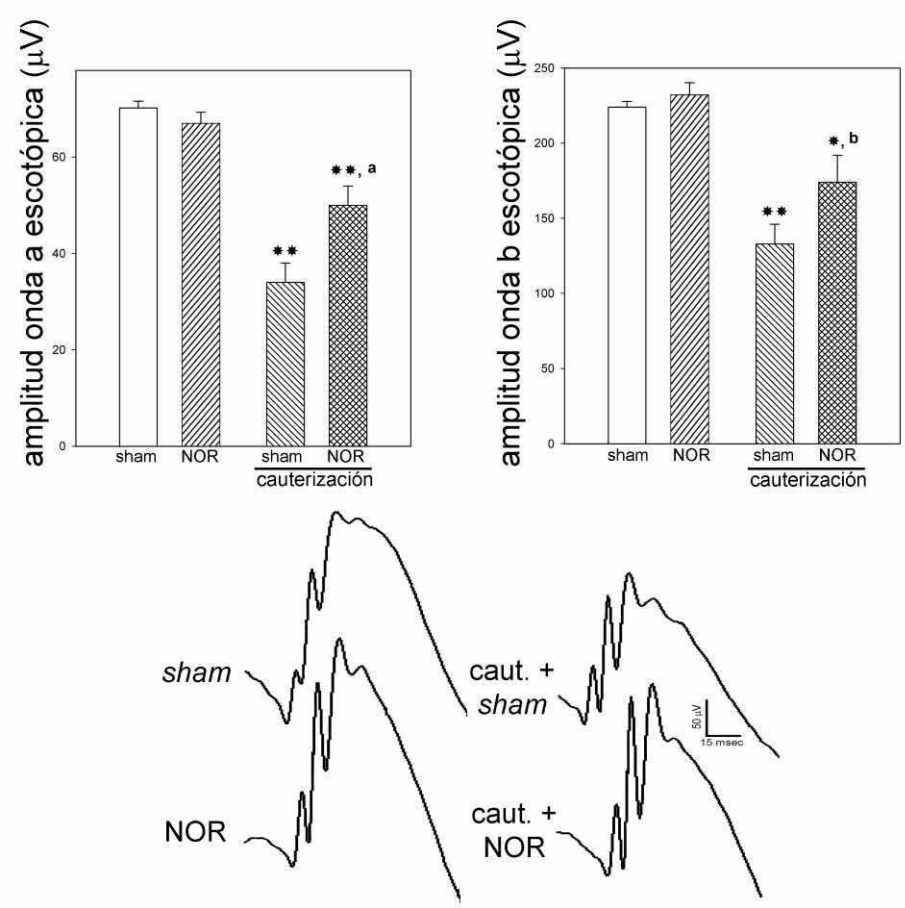

Figura 66. Se registraron ERGs a los 30 días de la cauterización de las venas epiesclerales. La hipertensión ocular indujo una disminución significativa en la amplitud de las ondas a y b del ERG, en comparación con los ojos control más

operación simulada. En ojos hipertensos sometidos a NOR 5 días después de la cauterización, se observó una preservación parcial pero significativa de estos parámetros. Se representan las medias ± EE (n = 10 animales /grupo); *p< 0,05, **p< 0,01; vs. ojos control más operación simulada, a: p< 0,01; b: p< 0,05 vs. ojos cauterizados más operación simulada, test de Tukey. Panel inferior: se muestran registros representativos del ERG de los distintos grupos experimentales.

Asimismo, la disminución en la amplitud del componente N2-P2 del VEP en los animales con cauterización más el tratamiento simulado fue totalmente revertida por la NOR (Figura 67).

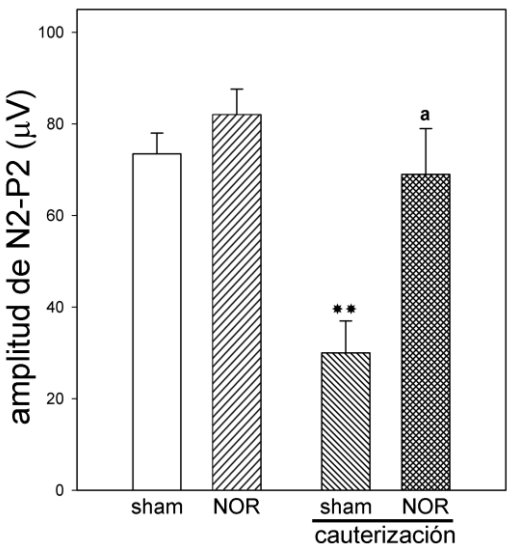

Figura 67. VEPs en ojos control o cauterizados con o sin NOR. Los VEPs se registraron a los 30 días post-cauterización. Se muestran las amplitudes promedio del componente N2-P2 del VEP. Se observó una reducción significativa de este parámetro en los ojos cauterizados más sham; la NOR revirtió esta caída. Se representan las medias ± EE (n = 10 ojos/grupo), **p< 0,01 vs. ojos control más operación simulada, a: p< 0,01 vs. ojos cauterizados más operación simulada (sham), test de Tukey.

En animales con cauterización más el tratamiento simulado, se observó una disminución significativa en el número de células en la CCG, que fue totalmente revertida en ojos con NOR 5 días después del inicio de la cauterización (Figura 68).

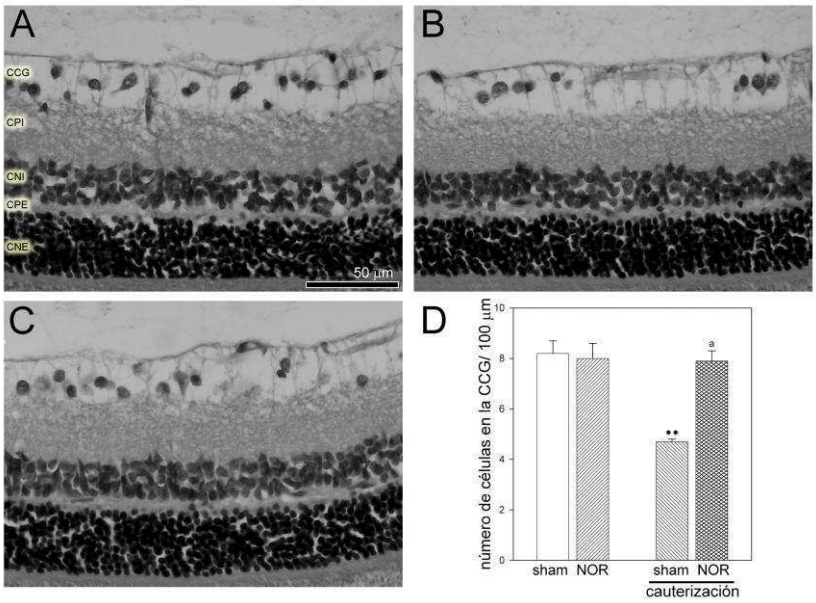

Figura 68. Efecto de la NOR sobre la pérdida de células en la CCG inducida por hipertensión ocular crónica. La NOR se realizó 5 días después del inicio de la hipertensión ocular. A los 30 días del tratamiento, se observó una disminución significativa en el número de células en la CCG en los animales cauterizados más operación simulada (B), en comparación con los ojos control más sham (A). El tratamiento con NOR (C) revirtió significativamente el efecto de la hipertensión ocular crónica. (D): Cuantificación de células en la CCG/100 µm ± EE (n = 5 animales/grupo). **p< 0,01 vs. ojos control más operación simulada, a: p< 0,01 vs. ojos cauterizados más operación simulada (sham), test de Tukey.

En conjunto, estos resultados avalan la potencialidad del uso de la NOR como una nueva estrategia quirúrgica en el tratamiento del glaucoma.

DISCUSIÓN

El objetivo central de este trabajo de Tesis fue examinar la viabilidad de las siguientes estrategias terapéuticas para el tratamiento del glaucoma experimental, diferentes en su esencia y fundamentadas en distintos aspectos de la enfermedad: 1) Tratamiento con melatonina, 2) Inducción de tolerancia isquémica y 3) La neurotomía óptica radial.

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 la pérdida progresiva de las funciones visuales, que se correlaciona con la muerte de CGR y excavación papilar con atrofia de la cabeza del nervio óptico. El aumento de la PIO desempeña un rol causal, aunque no necesariamente exclusivo, en la pérdida visual glaucomatosa. De hecho, si bien la disminución de la PIO es por ahora la terapia de elección, en muchos casos la disfunción visual persiste o incluso progresa luego de su restauración a valores normales. Parece poco probable que se logre desentrañar los mecanismos involucrados en el daño glaucomatoso a través de estudios que se limiten a analizar los cambios clínicamente observables en la retina y el nervio óptico de pacientes con glaucoma. Por lo tanto, resulta necesario realizar estudios mucho más detallados e invasivos, preferentemente en un modelo animal disponible. En trabajos previos de nuestro laboratorio hemos desarrollado un modelo experimental de glaucoma unilateral en ratas a través de la administración crónica (1 vez/semana) de AH en la cámara anterior del ojo, que aventaja a los modelos preexistentes en varios aspectos: 1) es un método económico, fácil de realizar, y no requiere técnicas quirúrgicas complejas, 2) permite obtener una PIO alta y persistente, 3) puede obtenerse un curso temporal razonablemente largo como para modelar una patología crónica, 4) las variaciones diarias de la PIO persisten en los ojos inyectados con AH y 5) a diferencia de los modelos de cauterización de las venas epiesclerales, el AH no afecta el flujo sanguíneo hacia fuera del ojo (Benozzi y col., 2002; Moreno y col., 2005a). Asimismo, hemos demostrado que la inyección crónica de AH induce una disfunción retiniana y una pérdida

significativa de células en la CCG y de fibras de la cabeza del nervio óptico (Moreno y col., 2005a). En suma, estos resultados indican que la administración crónica de AH reproduce aspectos centrales del glaucoma humano.

La búsqueda de modelos animales para la patología humana persigue tres objetivos esenciales:

a) Reproducir en condiciones controladas y con la mayor exactitud posible las características patognomónicas de la enfermedad que se pretende modelar,

b) Elucidar los mecanismos etiopatogénicos involucrados en el desarrollo de la enfermedad,

c) Desarrollar terapias de nueva generación.

Habiendo satisfecho el primer aspecto, en trabajos previos hemos logrado avances de consideración en el segundo de ellos. En este sentido, previamente demostramos que la hipertensión ocular provoca una caída significativa en la actividad del sistema antioxidante endógeno retiniano, lo que podría sugerir un aumento en el estrés oxidativo retiniano. Esta hipótesis es avalada por el incremento en la peroxidación lipídica, que aumentó significativamente en retinas de ojos con hipertensión inducida por AH (Moreno y col., 2004). Asimismo, los niveles retinianos de melatonina (un compuesto con probadas propiedades antioxidantes a nivel local) disminuyen significativamente en ojos inyectados con AH ya a partir de las 3 semanas de hipertensión ocular, caída que progresa hasta las 10 semanas de tratamiento (Moreno y col., 2004). En estudios posteriores, demostramos una disminución en el influjo retiniano de glutamato y en la actividad de glutamina sintetasa a las 3 semanas de hipertensión ocular. Estos cambios podrían contribuir en forma sinérgica y/o redundante a un aumento significativo en las concentraciones sinápticas de glutamato (Moreno y col., 2005b). Más recientemente demostramos que la hipertensión ocular inducida por AH disminuye significativamente el turnover de GABA, la actividad de GAD y la liberación de GABA inducida tanto por glutamato como por alto K^+ y aumenta el uptake de GABA. Estos resultados demuestran un déficit en la actividad GABAérgica retiniana en ojos con hipertensión ocular

(Moreno y col., 2008). La excitoxicidad es un mecanismo patogénico relativamente frecuente en enfermedades neurodegenerativas que puede atribuirse a una falla en los mecanismos que controlan los niveles sinápticos de glutamato, así como en los mecanismos compensatorios anti-excitatorios necesarios para mantener la homeostasis tisular. Los resultados obtenidos previamente indican que la hipertensión ocular afecta la actividad sináptica de los sistemas glutamatérgico y GABAérgico, provocando una prevalencia de excitación sobre inhibición, que a su vez podría desencadenar efectos deletéreos a nivel celular.

Entre los posibles blancos sensibles a un exceso de señales glutamatérgicas y frente a una reducción del freno GABAérgico inhibitorio, el NO merece particular atención. De hecho, como se mencionó en la Introducción, diversas líneas de evidencia avalan la participación del sistema nitrérgico en la neuropatía glaucomatosa. Por lo tanto, se consideró de interés el examinar la actividad de este sistema en el modelo de glaucoma experimental inducido por AH.

Los resultados obtenidos en esta Tesis indican una activación significativa del sistema nitrérgico en ojos hipertensos. El NO es una molécula ubicua que participa en una gran variedad de funciones celulares. Sin embargo, particularmente en altas concentraciones y en conjunto con las ROS, el NO puede transformarse en agentes citotóxicos de gran poder deletéreo y relevancia fisiopatológica. Como molécula de señalización intracelular, el NO modula la actividad de varias proteínas que contribuyen a la apoptosis. (Martinez-Ruiz y Lamas, 2004). Por otra parte, se ha demostrado que una vía proteolítica extracelular en la retina contribuye a la muerte de las CGR a través de la activación por NO de la metaloproteinasa-9 (Melino y col., 1997). Aunque otros estudios avalan la participación del NO en el glaucoma humano o experimental, la mayoría de ellos han utilizado una estrategia inmunohistoquímica, a través del estudio de la inmunorreactividad para NOS o actividad de NADPH diaforasa en estructuras oculares, luego de distintos períodos de hipertensión ocular. Sin embargo, en ninguno de estos trabajos se evaluaron posibles cambios en la actividad del sistema nitrérgico. En este sentido, algunos autores han

descripto cambios en los niveles proteicos de algunas de las isoformas de NOS, particularmente de la isoforma inducible (Neufeld y col., 1999; Liu y Neufeld, 2000; Wang y col., 2005). Aunque en este trabajo de Tesis no se observaron cambios en los niveles proteicos de ninguna de las isoformas de NOS, los resultados obtenidos avalan un aumento significativo de la conversión de L-arginina a L-citrulina en retinas de ojos hipertensos. En la retina de diversas especies se ha detectado la presencia de carbamoil fosfato sintetasa I, ornitina transcarbamilasa, argininosuccinato sintetasa, argininosuccinato liasa y arginasa, lo que sugiere la existencia de una vía a través de la cual la L-arginina puede ser hidrolizada a urea y ornitina, sin síntesis de NO (Manabe y col., 2005; Koshiyama y col., 2000). Sin embargo, el hecho de que el aumento de la actividad de NOS en los ojos tratados con AH persistiera en presencia de un inhibidor de la arginasa, indica que la hipertensión ocular provoca un aumento de la biosíntesis retiniana de NO. La coexistencia de NOS y arginasa podría indicar que ambas enzimas intracelulares compiten por la L-arginina. Sin embargo, mientras que el Km de las isoenzimas de NOS para L-arginina se encuentra en el rango de 2 a 20 μM, el Km de la arginasa de mamíferos es de alrededor de 2 a 20 mM. (El-Remessy y col., 2003; Kaysen y Strecker, 1973). Por lo tanto, parece más probable que la arginina extracelular sea un sustrato preferencial de NOS, más que de arginasa.

Quedan aún por determinar los eventos intracelulares desencadenados por la hipertensión ocular que permitan explicar el aumento en la actividad de NOS, así como la identificación de la(s) isoforma(s) de NOS sensible(s) a la hipertensión ocular. Se han descripto diversos mecanismos capaces de modular la actividad de NOS, que incluyen: cambios en la disponibilidad del sustrato (Drexler y col., 1991), mecanismos de fosforilación (Dawson y col., 1993) y de acilación (Sessa, 1994), así como de localización subcelular (Michel y col., 1993), entre otros. Asimismo, diversas evidencias indican un vínculo relevante entre el glutamato y el sistema nitrérgico retiniano. En este sentido, se ha demostrado que las CGR en ratones deficientes en nNOS son relativamente resistentes al daño inducido por NMDA, mientras que el daño en la retina de ratones deficientes

en la isoforma eNOS no difiere significativamente del observado en animales control (Michel y col., 1993). Por otra parte, se demostró que la inyección intravítrea de NMDA en ratas induce la acumulación de nitratos/nitritos y aumenta la peroxidación lipídica (Vorwerk y col., 1997). Considerando estos antecedentes que señalan al glutamato como un activador clave de la nNOS, junto con los trabajos previos de nuestro grupo que demuestran un aumento en las concentraciones sinápticas de este neurotransmisor en retinas de ojos hipertensos, es tentador especular acerca de la existencia de una relación causal entre ambos fenómenos. De esta forma, el aumento en los niveles sinápticos de glutamato, actuando a través de receptores NMDA (que se expresan particularmente en las CGR (Aizenman y col., 1988), podría provocar un aumento en la actividad de nNOS en este modelo experimental. Sin desmedro de estas consideraciones, la participación de eNOS y/o iNOS en el aumento en la biosíntesis de NO en ojos tratados con AH no puede descartarse formalmente.

Teniendo en cuenta que la actividad de NOS fue evaluada en toda la retina, no se puede determinar el sustrato anatómico de los fenómenos observados. La distribución de las isoformas de NOS entre los diferentes tipos de células de la retina aún no se conoce en detalle, pero trabajos de otros autores indican que están presentes en al menos algún miembro de cada tipo de células retinianas. En retinas de humanos y ratas, la NOS-1 se expresa en los segmentos internos de los fotorreceptores, en células de la CNI, (particularmente las células amácrinas) y en las CGR (Closs y col., 1993), mientras que la NOS-2 se detectó en células localizadas tanto en la CNI como en la CCG y en procesos celulares de Müller a lo largo de CNI, CCG y en el segmento interno de fotorreceptores.(Blute y col., 2000). En todo caso, el NO es una molécula altamente difusible y por lo tanto, el sitio de su síntesis no implica necesariamente su sitio de acción. En caso de confirmarse los resultados obtenidos, la coexistencia de nNOS y receptores NMDA en las CGR podría indicar un aumento preferencial de los niveles de NO en este tipo celular, que constituye el principal blanco de daño glaucomatoso.

Los resultados obtenidos indican un aumento significativo en el uptake de L-arginina, así como en los niveles de ARNm de los transportadores CAT-1 y CAT-2 en ojos tratados con AH. Debido a que el ensayo de la actividad de NOS implica la incubación de homogenatos de retina en presencia de concentraciones controladas de L-arginina, es posible suponer que la mayor actividad de NOS en ojos hipertensos no es una mera consecuencia del aumento en el influjo de L-arginina. La NOS purificada de distintos tejidos tiene una alta afinidad por L-arginina (EC_{50} ~ 10 μM). Dado que los niveles intracelulares de este aminoácido determinados en varios sistemas oscilan entre 0,1-1 mM (Block y col., 1995), sería esperable que la L-arginina endógena fuera suficiente para la saturación de la enzima. Sin embargo, diversos estudios in vivo e in vitro indican que la síntesis de NO en condiciones fisiológicas puede ser aumentada por L-arginina extracelular, a pesar de las concentraciones intracelulares saturantes. Se ha denominado a este fenómeno como "la paradoja de la arginina" (Kurz y Harrison., 1997). Una posible explicación para ello, podría ser que la L-arginina intracelular se encuentra localizada en un pool de poco acceso a la NOS, mientras que la L-arginina extracelular es transportada al interior celular, y alcanza un acceso preferencial a esta enzima (Kurz y Harrison., 1997). En este sentido, se ha demostrado que la disponibilidad de L-arginina controla la síntesis de NO inducida por NMDA en el sistema nervioso central de rata (Grima y col., 1998). Por lo tanto, parece posible que para provocar activación de la NOS, es condición necesaria un aumento en el influjo del aminoácido.

Se ha demostrado la coordinación entre el influjo de L-arginina y la actividad de NOS en diversos sistemas, como cerebro de rata (Stevens y col., 1996) y retinas de ratas diabéticas (do Carmo y col., 1998). Consecuentemente, estos resultados sugieren una coordinación similar en la retina de ojos hipertensos. Asimismo, se ha demostrado que la activación de receptores NMDA en células retinianas en cultivo promueve un aumento en el pool intracelular de L-arginina disponible para la síntesis de NO (Cossenza y col., 2006). De esta forma, tanto el aumento en la

actividad de NOS como el transporte de L-arginina podrían responder a niveles elevados de glutamato sináptico en retinas de ojos inyectados con AH.

La unión del NO al hierro hémico de la guanilato ciclasa soluble y su consiguiente activación, es un hecho ampliamente demostrado. Si el influjo de L-arginina y su conversión a NO son mayores en ojos inyectados con AH, sería esperable un aumento en los niveles retinianos de GMPc en retinas expuestas a hipertensión ocular. Aunque se observó un aumento significativo en la acumulación de GMPc en retinas de ojos inyectados con AH por 3 semanas, no se detectaron cambios similares luego de 6 semanas de tratamiento. No se dispone de una clara explicación para esta observación. Sin embargo, de acuerdo con los resultados presentados, tanto el aumento en la actividad de NOS como en el uptake de L-arginina fueron significativamente más bajos a las 6 que a las 3 semanas del tratamiento con AH. Además, dado que GMPc desempeña un papel crítico en la cascada de fototransducción, es altamente probable que los niveles retinianos de este nucleótido sean regulados por otros mecanismos además del NO.

Como se mencionó en la Introducción, aunque varios tipos de transporte podrían mediar el influjo de L-arginina, las evidencias disponibles indican que el transportador de tipo y+ es el candidato más probable en la retina de diversas especies (Sáenz y col., 2002). Este tipo de transportador abarca tres proteínas homólogas denominadas CAT-1, CAT-2 y CAT-3, que han sido caracterizadas en distintos tejidos. El transportador Cat-1 fue el primer gen clonado, está ampliamente expresado y el producto de su expresión posee características compatibles con el sistema y+. Posteriormente, se identificó otro transportador de aminoácidos catiónicos, denominado Cat-2, que comparte alta homología con el transportador Cat-1 y también posee características típicas del sistema y+ (Closs y col., 1993). El análisis por RT-PCR semicuantitativa demostró un aumento significativo en los niveles de ARNm que codifican para ambos transportadores en retinas de ojos hipertensos, tanto a las 3 como a las 6 semanas de tratamiento con AH. Si bien no se dispone al presente de anticuerpos comerciales que permitan

confirmar estos hallazgos a nivel de las respectivas proteínas, estos resultados sugieren un mecanismo de upregulation de las proteínas transportadoras de L-arginina en retinas de ojos hipertensos.

Teniendo en cuenta que las alteraciones funcionales inducidas por la inyección crónica de AH fueron evidentes a partir de la 6ta semana de tratamiento, que los cambios histológicos requirieron 10 semanas de hipertensión ocular y que la activación del sistema nitrérgico precedió a estos fenómenos, es posible que el NO participe en el desarrollo de la neuropatía glaucomatosa. Estos resultados sugieren que una disminución en la actividad del sistema nitrérgico podría constituir una estrategia terapéutica para prevenir la muerte celular inducida por glaucoma.

Como ya se mencionó, resultados previos indican que el aumento en los niveles sinápticos de glutamato, el déficit en la actividad GABAérgica, el daño oxidativo y el incremento en los niveles de NO podrían constituir factores causales en la neuropatía glaucomatosa. La siguiente serie de experimentos tuvo por objeto el estudio del efecto de la melatonina sobre el daño inducido por el glaucoma experimental. Diversas evidencias sugieren que la melatonina puede ejercer un efecto neuroprotector contra la excitotoxicidad inducida por glutamato en varios tejidos, incluyendo neuronas de retina de pollo (Cazevieille y col., 1997; Espinar y col., 2000; Chung y Han, 2003; Lima y col., 2003). En trabajos previos de nuestro laboratorio se demostró que la melatonina disminuye significativamente las concentraciones sinápticas de glutamato en la retina del hámster dorado (Sáenz y col., 2004). Con el objeto de extender las consecuencias conceptuales de este efecto a la retina de rata y particularmente en el marco del estudio del efecto de la melatonina como herramienta para el tratamiento del glaucoma, se analizó el efecto del metoxiindol sobre algunos de los componentes del ciclo glutamato/glutamina en retinas de ratas control. Los resultados obtenidos indican que la melatonina aumentó significativamente el influjo de glutamato y la actividad de glutamina sintetasa y disminuyó la actividad de glutaminasa retiniana. Diversas evidencias indican un acoplamiento efectivo entre el transporte

de glutamato y la actividad de glutamina sintetasa. Aunque se ha demostrado una regulación común a nivel transcripcional del transportador retiniano de glutamato más abundante (GLAST) y de la glutamina sintetasa en células de Müller en cultivo (Delyfer y col., 2005), y dado que el efecto de la melatonina sobre ambos parámetros fue evidente luego de un período corto de incubación (es decir, 30 minutos), resulta poco probable la participación de mecanismos de transcripción y/o traducción. Por lo tanto, parece posible que no sólo la expresión sino también la actividad de las proteínas que median el uptake y la degradación del glutamato liberado sinápticamente podrían ser reguladas en forma coordinada. Los resultados obtenidos indican que la melatonina no sólo aumentó la síntesis de glutamina catalizada por la glutamina sintetasa, sino también disminuyó su conversión a glutamato inhibiendo la actividad de glutaminasa. De esta forma, la melatonina podría contribuir a disminuir los niveles de glutamato a través de mecanismos posiblemente redundantes. (Figura 69)

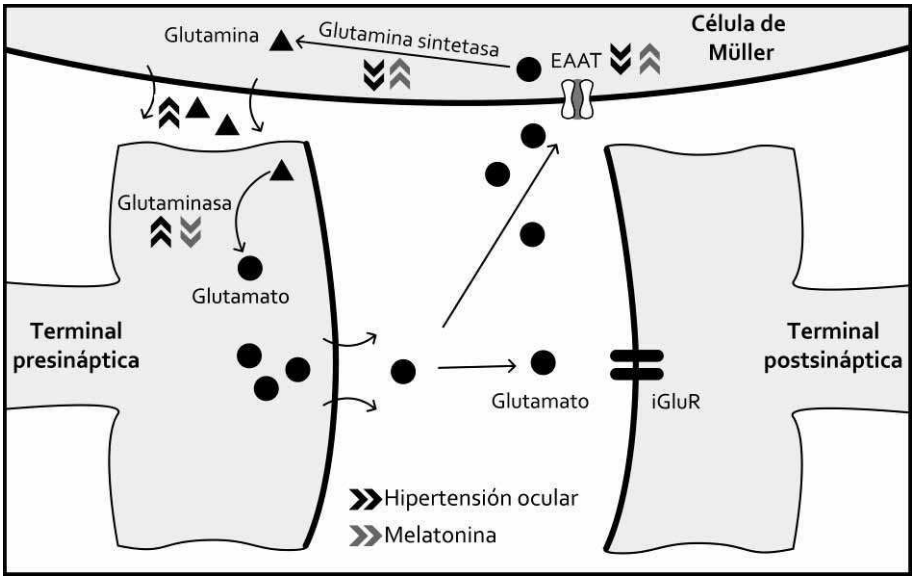

Figura 69. Representación esquemática del ciclo glutamato/glutamina retiniana, y su modulación por melatonina e hipertensión ocular. En trabajos previos se demostró que la hipertensión ocular inducida por AH disminuye el uptake de glutamato y la actividad de glutamina sintetasa y aumenta la liberación y el influjo de glutamina y la actividad de glutaminasa (Moreno y col., 2005). En este trabajo demostramos que la melatonina aumentó el uptake de glutamato, y la actividad de glutamina sintetasa y disminuyó la actividad de glutaminasa. Los efectos positivos se denotan como ⩓, en tanto que ⩔ indica efectos negativos.

La siguiente serie de experimentos tuvo por objeto examinar el efecto de la melatonina sobre la actividad del sistema GABAérgico en ratas control. Los resultados obtenidos en esta Tesis indican que la melatonina aumentó el turnover de GABA y la actividad de la enzima que cataliza su síntesis. Estos resultados que se correlacionan con efectos similares de la melatonina en la glándula pineal, el cerebelo, el hipotálamo y la corteza cerebral de rata (Rosenstein y Cardinali, 1986; Rosenstein y col., 1989), avalan la hipótesis de que el sistema GABAérgico central podría ser un target primario para la acción de la melatonina (Figura 70).

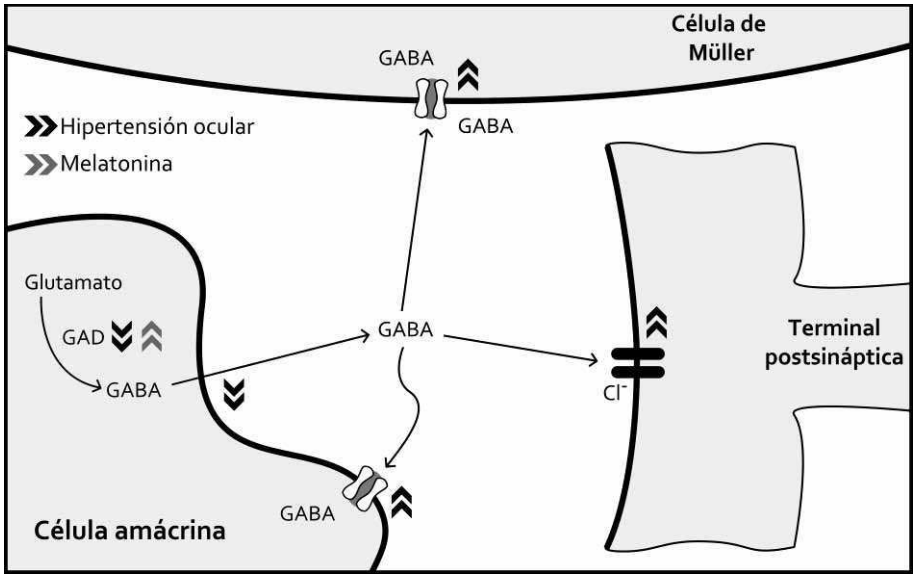

Figura 70. Representación esquemática de la modulación de la actividad del sistema GABAérgico retiniano por la hipertensión ocular y la melatonina. En trabajos previos se demostró que la hipertensión ocular inducida por AH aumenta significativamente el uptake de GABA y disminuye el turnover de GABA, la actividad de GAD y la liberación de GABA (Moreno y col., 2008). En este trabajo demostramos que la melatonina aumentó el turnover de GABA y la actividad de GAD. Los efectos positivos se denotan como ⩓, en tanto que ⩔ indica efectos negativos.

Este conjunto de resultados sugieren que la melatonina podría revertir el desbalance entre señales excitatorias e inhibitorias inducido por la hipertensión ocular crónica y a través de estos mecanismos, la melatonina podría restablecer el equilibrio neuronal retiniano.

A continuación, se analizó el efecto de la melatonina sobre los otros posibles mecanismos etiopatogénicos identificados en la neuropatía inducida por AH: el sistema nitrérgico y el sistema de defensa antioxidante. La melatonina disminuyó significativamente la actividad de NOS y el uptake de L-arginina. Estos resultados se correlacionan con la descripción previa de efectos similares del metoxiindol en otras áreas del sistema nervioso central de rata, como el hipotálamo (Bettahi y col., 1996), el cerebelo (Pozo y col., 1997), y la corteza cerebral frontal (León y col., 1998). Sin embargo, mientras que el efecto inhibitorio de la melatonina sobre la actividad de NOS en estos tejidos fue evidente a partir de una concentración de 1 nM, en la retina de la rata resultó evidente una mayor sensibilidad al metoxiindol, ya que el efecto inhibitorio sobre la actividad de NOS ocurrió incluso a una concentración de 0,1 nM, lo que sugiere que la NOS retiniana podría ser más susceptible a la melatonina. Además de inhibir la actividad de NOS, la melatonina tiene la capacidad de actuar como scavenger de NO, generando al menos un producto estable, la N-nitrosomelatonina (Turjanski y col., 2000). En conjunto, estos resultados indican que la melatonina modula el sistema nitrérgico de manera opuesta a la inducida por la hipertensión ocular, como se muestra en la Figura 71.

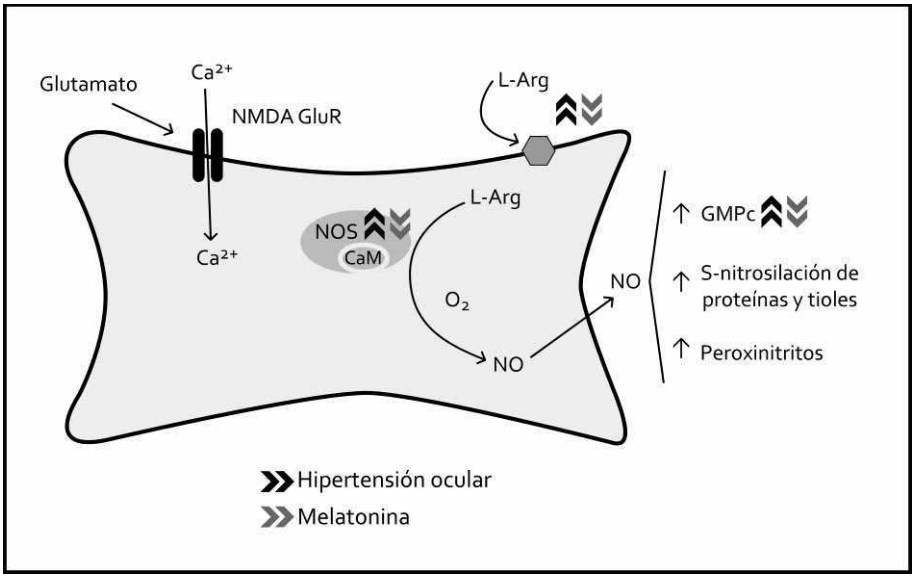

Figura 71. Representación esquemática del sistema nitrérgico retiniano y su modulación por la melatonina y la hipertensión ocular. En esta Tesis se

demostró que la hipertensión ocular inducida por AH induce un aumento en la actividad de NOS retiniana y en el uptake de L-arginina y que la melatonina regula estos parámetros en un sentido contrario. Los efectos positivos se denotan como ⩓, en tanto que ⩔ indica efectos negativos.

Existe amplio consenso en que la melatonina es un potente inhibidor del estrés oxidativo. Los mecanismos involucrados en el efecto antioxidante de la melatonina incluyen: a) actuar como scavenger de radicales libres (Poeggeler y col., 1993; Reiter y col., 2009), b) estimular las enzimas antioxidantes (Rodriguez y col., 2004), c) aumentar la eficiencia de la fosforilación oxidativa mitocondrial y reducir los niveles de radicales libres (León y col., 2005) y d) aumentar la eficacia de otros antioxidantes (Reiter y col., 2009). Los resultados de esta Tesis indican que la melatonina aumentó la actividad del sistema antioxidante endógeno. En particular, se observó que concentraciones fisiológicas del metoxiindol incrementaron significativamente las actividades de superóxido dismutasa (SOD) y los niveles de glutatión reducido (GSH), aunque no afectaron la actividad de catalasa. Además se observó una disminución en la peroxidación lipídica retiniana.

La mayoría de los efectos de la melatonina descriptos en este trabajo fueron evidentes en concentraciones en el rango nanomolar bajo (0,1 a 1 nM), compatibles con receptores de melatonina de alta afinidad (~100 pM) (Rosenstein y Dubocovich, 2001). Esta alta sensibilidad de la melatonina sugiere que el metoxiiindol modula estos parámetros retinianos, probablemente a través de mecanismos mediados por receptor. No obstante, se ha descripto una variedad considerable de efectos antioxidantes de la melatonina que involucran mecanismos no mediados por receptor. Por lo tanto, parece probable que los efectos de la melatonina descriptos en este trabajo pueden involucrar tanto mecanismos dependientes como independientes de la unión de melatonina a receptores específicos. En suma, estos resultados junto con antecedentes de nuestro grupo y de otros autores indican que la melatonina: 1) disminuye las concentraciones sinápticas de glutamato, 2) aumenta la actividad del sistema GABAérgico retiniano, 3) disminuye la

síntesis de NO y 4) es un antioxidante retiniano. Dado que la excitoxicidad glutamatérgica, la disminución de la actividad GABAérgica, el aumento en los niveles de NO, y el daño oxidativo podrían constituir factores causales de la neuropatía glaucomatosa, este conjunto de evidencias avalan la potencialidad del uso de melatonina con fines terapéuticos en el glaucoma. Esta hipótesis adquiere una revelancia adicional si se considera que los niveles retinianos de este metoxiindol disminuyen significativamente en animales inyectados con AH desde etapas tempranas de hipertensión ocular (Moreno y col., 2004). En la Figura 72 se resumen los efectos de la hipertensión ocular y de la melatonina comparativamente.

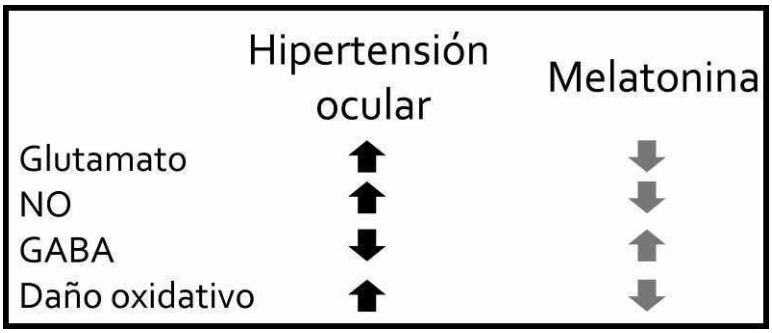

Figura 72. Representación esquemática de los efectos retinianos de la hipertensión ocular y la melatonina. En este trabajo de Tesis se demostró que la melatonina moduló todos estos parámetros de manera opuesta. Los efectos positivos se denotan como ↑ y los efectos negativos como ↓.

Por lo tanto, el conjunto de resultados obtenidos permiten sugerir que mientras la administración de melatonina exógena podría ser beneficiosa en el tratamiento del glaucoma, la caída en los niveles endógenos del metoxiindol podría participar en el inicio de esta enfermedad. Sobre la base de evidencias que indican que la melatonina modificó con signo contrario varios de los posibles mecanismos patogénicos asociados a la hipertensión ocular, la siguiente serie de experimentos tuvo como objetivo demostrar formalmente el efecto del metoxiindol sobre las alteraciones funcionales e histológicas inducidas por hipertensión ocular crónica. Para ello, en una serie preliminar de experimentos se intentó una aplicación diaria del metoxiindol por vía

subcutánea, que debió ser descartada por las lesiones dérmicas provocadas en los animales luego de inyecciones repetidas, tanto de melatonina como de vehículo. Por esta razón se optó por la implantación de un pellet subcutáneo de melatonina cada 15 días. Para la elección del momento más propicio para el inicio del tratamiento con melatonina, se consideró en forma conjunta la suma de los datos obtenidos respecto a la progresión de la neuropatía glaucomatosa experimental y de los fenómenos neuroquímicos identificados como posibles factores causales. En este sentido, en el modelo de glaucoma experimental en ratas inducido por AH se han identificado tres estadíos diferentes, que presentan las siguientes características:

• **3 semanas de hipertensión ocular inducida por AH**: aumento en los niveles sinápticos de glutamato, disminución de la actividad GABAérgica, activación del sistema nitrérgico, daño oxidativo incipiente y disminución de los potenciales oscilatorios (POs), sin cambios en los electrorretinogramas (ERGs), ni cambios histológicos: **hipertensión ocular asintomática.**

• **6 semanas de hipertensión ocular inducida por AH**: persistencia de la activación del sistema nitrérgico, aumento (respecto a 3 semanas) del daño oxidativo y de la disminución de los POs, caída en los ERGs, sin cambios histológicos: **glaucoma moderado.**

• **10 semanas de hipertensión ocular inducida por AH**: aumento (respecto a 6 semanas) del estrés oxidativo, aumento (respecto a 6 semanas) de la disfunción electrorretinográfica, disminución en el número de células ganglionares y de fibras del nervio óptico: **glaucoma avanzado.**

Teniendo en cuenta que la melatonina podría antagonizar algunos de los mecanismos patogénicos de aparición temprana, en una primera etapa, se realizaron experimentos diseñados con el fin de demostrar un posible efecto preventivo de la melatonina sobre la neuropatía glaucomatosa. Para ello, se inició la administración de melatonina 24 h antes de la primera inyección de AH. Si bien este tratamiento preventivo es de escasa transferencia eventual a la clínica, los resultados podrían permitir obtener indicios de significación sobre el efecto de

melatonina y dependiendo de la viabilidad de la hipótesis justificarían experimentos posteriores con administración de melatonina en una fase más tardía.

Los resultados obtenidos mediante esta estrategia demuestran que la administración de melatonina previno las alteraciones electrorretinográficas e histológicas inducidas por hipertensión ocular. En cuanto a la actividad electrorretinográfica, los resultados indican que la melatonina redujo significativamente la caída en el ERG escotópico e indujo una protección también significativa de los efectos deletéreos de la hipertensión ocular crónica sobre las células en la CCG. A pesar de la neuroprotección significativa observada en el glaucoma experimental inducido por AH, la relevancia de estos resultados está limitada por el hecho de que la melatonina se administró en forma previa al inicio de la hipertensión ocular. Por lo tanto, la siguiente serie de experimentos tuvo por objeto examinar si la melatonina no sólo previene sino también reduce el daño glaucomatoso. Los presentes resultados indican que el tratamiento con melatonina iniciado en etapas más avanzadas de glaucoma experimental (es decir a la 6ta semana de hipertensión ocular), indujo también una protección significativa en estas condiciones. Al presente, no se dispone de una explicación clara para estos resultados. Trabajos previos de nuestro laboratorio, han demostrado que el aumento en las concentraciones de glutamato sináptico (Moreno y col., 2005b) y una disfunción GABAérgica (Moreno y col., 2008) ocurren antes de la 6ta semana de tratamiento con AH. En este trabajo hemos demostrado que la cinética del efecto de la hipertensión ocular sobre la actividad del sistema nitrérgico es similar, es decir, es también un evento relativamente temprano en el curso de la enfermedad. Por lo tanto, parece posible que las alteraciones en el glutamato, el NO, y el GABA pueden desencadenar un insulto inicial responsable de la iniciación del daño que es seguido por una degeneración más lenta y secundaria que finalmente resulta en la muerte celular. En ese sentido, en trabajos previos se ha demostrado que el estrés oxidativo es un fenómeno más duradero que persiste incluso a las 10 semanas de hipertensión ocular (Moreno y col., 2004). En este escenario, el efecto preventivo de

la melatonina (evidenciado por la administración de melatonina antes de la primera inyección de AH) podría explicarse por la disminución de los niveles de glutamato y NO, y por el aumento en las concentraciones de GABA, mientras que su efecto terapéutico (evidenciado por la administración de melatonina a partir de la 6ta semana de hipertensión ocular) podría explicarse fundamentalmente por su efecto antioxidante. En este contexto, el hecho de que la melatonina resultó similarmente eficaz en los animales tratados desde el inicio que con un tratamiento más tardío, podría apoyar la hipótesis de que en ambos casos, la melatonina es capaz de revertir el daño oxidativo, lo que podría ser un factor clave en la disfunción glaucomatosa y la muerte celular.

El efecto de la melatonina sobre la PIO es aún controversial. Varios estudios no encontraron efectos de la aplicación tópica, inyección intravenosa o intravítrea de melatonina sobre la PIO de conejo (Kiuchi y col., 1993; Meyer-Bothling y col., 1993), mientras que otros grupos han demostrado que la administración oral o tópica reduce significativamente la PIO en conejos (Pintor y col., 2001), monos (Serle y col., 2004) y humanos (Samples y col., 1988). En las condiciones experimentales usadas en este trabajo, el pellet de melatonina no modificó la PIO durante las 10 semanas de tratamiento con AH. Por el momento, no disponemos de ninguna explicación para esta discrepancia. Sin embargo, las diferencias en la especie (ratas, en nuestro caso), la vía de administración o la dosis podrían ser responsables de estas diferencias.

Se ha sugerido que la neuroprotección en el glaucoma implica el uso de drogas o productos químicos para frenar cualquier causa que provoca la pérdida de la visión (la muerte de las CGR) sin afectar la PIO. Para ser eficaz, un neuroprotector debe llegar a la cabeza del nervio óptico y/o las CGR y por lo tanto probablemente la administración deba ser vía oral. Como se demostró en este trabajo, administrada por vía subcutánea, la melatonina alcanza la retina, aumentando los niveles locales de metoxiindol. Considerando que un compuesto con estas características se distribuirá en forma sistémica, cualquier efecto secundario de un neuroprotector debe ser

reducida al mínimo. Además, las CGR pueden morir por diferentes mecanismos en el glaucoma, lo que sugiere que un neuroprotector con la capacidad de poseer un amplio espectro de acción probablemente sea más eficaz frente al daño el glaucomatoso. Los resultados obtenidos indican que la melatonina podría cumplir con todos los requisitos para ser incluidos en el arsenal de recursos terapéuticos oftálmológicos, particularmente como neuroprotector en el tratamiento del glaucoma. Sola o en combinación con una terapia ocular hipotensora, el tratamiento con melatonina, un compuesto muy seguro para el consumo humano (revisado en Morera y col., 2001; Seabra y col., 2000; Nordlund y Lerner, 1977), podría constituir una nueva herramienta terapéutica para el tratamiento de esta enfermedad visual prevalente e invalidante.

Los siguientes objetivos de este trabajo de Tesis fueron analizar otras dos estrategias terapéuticas para el tratamiento del glaucoma. Sin embargo, como ya se mencionó, el proveedor de AH (Sigma®) sorpresivamente interrumpió en forma definitiva su producción, lo que resultó un gran perjuicio para la continuidad de esta línea de trabajo. A pesar de múltiples intentos, no nos resultó posible reemplazar el AH (Sigma®, nº de catálogo H1751) con otras preparaciones de la misma empresa u otros orígenes, lo que nos llevó a la búsqueda de un modelo alternativo de glaucoma experimental en ratas. Sobre la base de las consideraciones mencionadas en la Introducción, los experimentos cuyos resultados se discutirán a continuación tuvieron por objeto desarrollar un modelo alternativo de glaucoma experimental en ratas a través de inyecciones intracamerales de condroitín sulfato (CS). Los resultados obtenidos indican que una inyección aguda de CS en la cámara anterior del ojo de rata aumentó significativamente la PIO en comparación con los ojos inyectados con vehículo, en forma dependiente de la dosis. Una inyección única de 40% de CS mantuvo niveles elevados de PIO durante siete días, alcanzando valores similares al control en el 8vo día post-inyección. Aunque el destino intraocular del CS es aún desconocido, el descenso lento de la PIO observado después de una inyección única, sugiere que el CS podría salir de la cámara anterior por el flujo de humor acuoso y/o ser degradado por

una actividad de condroitinasa local. Dado que el aumento de la PIO fue transitorio, se realizaron inyecciones semanales de CS con el fin de mantener un aumento sostenido de este parámetro. La PIO de los ojos tratados semanalmente con CS alcanzó un nivel de estado estacionario similar al provocado por una inyección única de CS, que fue significativamente mayor que el de los ojos inyectados con vehículo y se prolongó a lo largo de la duración del estudio (10 semanas).

Diversos viscoelásticos que contienen AH y CS, como el Viscoat ® (3,0% AH - 4,0% CS) se han convertido en herramientas casi imprescindibles en la cirugía del segmento anterior del ojo humano para reducir el trauma del tejido y la pérdida de células endoteliales, así como para mantener el volumen de la cámara anterior. Sin embargo, es bien sabido que estos agentes son responsables de causar o exacerbar un aumento transitorio pero significativo de la PIO después de la cirugía. Dado que los agentes viscoelásticos con AH pero sin CS como el Healon (1% AH), el Healon ® 5 (2,3% AH) y el GV Healon ® (1,4% AH) también aumentan la PIO en humanos, el efecto hipertensivo del Viscoat® podría ser atribuido al AH. De hecho, como ya se mencionó, en trabajos previos demostramos que la inyección intracameral de AH induce un aumento significativo de la PIO en ratas. Aunque se ha demostrado que la administración intracameral de CS aumenta la PIO en gatos pero no en conejos (Zhu y Cai, 1992), el efecto del CS sobre la PIO de ratas no había sido previamente examinado. Inyecciones repetidas de CS (9 mg/ojo) en la cámara anterior de ojos de gato aumenta la PIO en 4 a 7 mm Hg por encima de la de los ojos control (Fei y col., 1984), en tanto que en ojos de ratas se observó un incremento de casi un 100% (~ 10 mm Hg) en ojos inyectados con CS al 40% (8 mg/ojo). Dado que la cámara anterior del ojo de rata es muy estrecha, la mayor hipertensión ocular provocada por el CS en la rata que en el gato podría atribuirse al hecho de que las concentraciones intracamerales “reales” de CS en el ojo de rata podrían ser superiores a las alcanzadas en el ojo de gato. Además, no puede descartarse una menor capacidad de lavado del CS en la cámara anterior de la rata.

La eficacia del CS para aumentar la PIO en la rata fue similar a la obtenida a través de inyecciones de AH. Sin embargo, para alcanzar una hipertensión ocular similar, fue necesaria una mayor concentración de CS (40%) que de AH (1%). El dominio de AH es dependiente de la concentración y forma una red polimérica continua a una concentración de 1 mg/ml. Por el contrario, el dominio de CS es limitado y adquiere una configuración de "cepillo para botellas" sin formar una red polimérica. Además, numerosas moléculas de CS se unen a una sola columna vertebral de AH para formar el agregado de un proteoglicano típico. Por lo tanto, es esperable que la cantidad de CS necesaria para aumentar la PIO sea mucho mayor que la de AH. Estos resultados confirman el conocimiento preexistente sobre la polimerización de AH y las propiedades de agregación del CS. Por otra parte, además de las diferencias estructurales, diferencias en el turnover de estos dos glicosaminoglicanos (GAGs) podrían explicar esta observación. A pesar de las concentraciones relativamente altas de CS necesarias para inducir una hipertensión ocular sostenida, no se observaron signos de inflamación en los ojos inyectados crónicamente con CS.

Se ha sugerido que los GAGs pueden reducir el diámetro funcional de los canales de flujo a través de los espacios corneoesclerales intertrabeculares profundos y/o regular el flujo a través de la membrana basal juxtacanalicular. Por lo tanto, es posible que el CS inyectado en forma intracameral actúe de manera similar al CS endógeno (es decir, impidiendo el flujo normal de humor acuoso). Es bien sabido que la hipertensión ocular desempeña un rol causal, aunque no necesariamente exclusivo, en la pérdida visual glaucomatosa. De hecho, no todos los modelos experimentales de hipertensión ocular crónica causan las mismas alteraciones en la retina o en la cabeza del nervio óptico. Por lo tanto, los siguientes experimentos se realizaron con el fin de evaluar las consecuencias funcionales e histológicas de la hipertensión ocular crónica inducida por inyecciones semanales de CS.

Diversas observaciones de nuestro grupo y de otros autores indican que algunos componentes del ERG pueden ser afectados en modelos experimentales de glaucoma. Considerando que las inyecciones crónicas de CS indujeron una disminución significativa en la amplitud de las ondas a y b del ERG escotópico que fue evidente a las 6 semanas de tratamiento, los resultados obtenidos en esta Tesis apoyan esta observación. Además, el hecho de que se observara una reducción adicional de estos parámetros después de 10 inyecciones semanales de CS sugiere una disfunción retiniana progresiva asociada con la hipertensión ocular crónica, una característica común con el glaucoma humano. En concordancia con estos resultados, en un modelo de glaucoma experimental inducido por oclusión de tres venas epiesclerales en ratas, se demostró una disminución significativa de la amplitud de las ondas a y b del ERG (Bayer y col., 2001a). Cambios similares en el ERG de flash se demostraron en el ratón DBA/2J, un modelo espontáneo de glaucoma de ángulo cerrado (Bayer y col., 2001b) y en ojos inyectados crónicamente con AH en la cámara anterior (Moreno y col., 2005a). Por otra parte, Viswanathan y col., (2000), demostraron cambios en el ERG que se correlacionan con las respuestas en el ERG pattern en un modelo de glaucoma inducido por aplicación de láser en monos. Asimismo, se ha descripto una reducción significativa en la amplitud de la onda b del ERG escotópico en ratas Brown Norway con inyección de solución hipertónica salina en una vena epiescleral (Chauhan y col., 2002).

Aunque los potenciales visuales evocados (VEPs) reflejan la actividad de todas las células de la vía óptica desde los fotorreceptores a la corteza visual, incluyendo las CGR y sus axones, ningún trabajo ha evaluado previamente los VEPs en modelos experimentales de glaucoma en roedores. En humanos, se ha demostrado que el glaucoma afecta los VEPs, provocando tanto reducciones en la amplitud (Papst y col., 1984) como aumentos en la latencia (Towle y col., 1983). Sin embargo, más recientemente (Grippo y col., 2006) demostraron sólo retrasos moderados en los VEPs de ojos glaucomatosos. Los resultados obtenidos en esta Tesis indican una disminución

significativa en la amplitud (pero no en la latencia) del componente N2-P2 del VEP en ojos expuestos a hipertensión ocular inducida por CS, que podría atribuirse a una reducción en la llegada de señales a la corteza visual y/o a alteraciones a nivel cortical. En concordancia con estos resultados, se demostró una reducción en la amplitud de los VEPs en monos con glaucoma experimental (Johnson y col., 1989). A pesar de las diferencias inter-especie en los generadores neuronales de los componentes del VEP, es posible que esta respuesta se origine en la corteza. Por lo tanto, es posible especular que las inyecciones crónicas de CS puedan afectar la respuesta post-sináptica del nervio óptico, además de las CGRs y la cabeza del nervio óptico.

La disfunción retiniana descripta resultó dependiente del tiempo de hipertensión ocular, ya que se observó una mayor disminución del ERG y los VEPs a las 10 que a las 6 semanas de hipertensión ocular, y no se observaron cambios en estos parámetros después de 3 semanas de tratamiento con CS.

En cuanto a la arquitectura de la retina, se observó un daño significativo limitado a la CCG y los axones del nervio óptico en los ojos inyectados con CS a las 10 semanas de tratamiento. En los ojos inyectados con vehículo, se observó una morfología intacta y compatible con un nervio óptico sano. Los axones individuales fueron generalmente uniformes y con un empaquetamiento estrecho formando las fibras del nervio. Por el contrario, en los ojos hipertensos se observó una pérdida de la integridad del nervio, así como una alteración en la forma de los axones. Además, resultó evidente una disminución marcada en el número de axones, siendo los axones grandes significativamente más vulnerables que las fibras de diámetro pequeño. Parece poco probable que este resultado pueda atribuirse a un encogimiento de los axones, ya que no se observaron cambios hacia diámetros más pequeños en la distribución del diámetro axonal. Esta pérdida de uniformidad a nivel de axones individuales podría explicar la pérdida total de uniformidad e integridad del nervio óptico. En concordancia con estos resultados, se ha demostrado una pérdida preferencial de los axones grandes del nervio óptico en otros modelos de glaucoma experimental

en ratas y monos (Levkovitch-Verbin y col., 2002; Glovinsky y col., 1991, Moreno y col., 2005a). En suma, estos resultados indican que inyecciones semanales de CS indujeron una elevación moderada y sostenida de la PIO, que a su vez, provocó alteraciones significativas en la función y la histología retiniana, compatibles con las alteraciones inducidas por el glaucoma humano de ángulo abierto. Por otra parte, junto con las evidencias que demuestran mayores niveles de CS en la malla trabecular de pacientes con glaucoma (Knepper y col., 1996), estos resultados sugieren que el aumento de los niveles de CS podría desempeñar un papel clave en la desregulación de la PIO característica del glaucoma. Esta nueva herramienta, permitió continuar con el cumplimiento de los objetivos originales de este trabajo de Tesis, es decir el estudio del efecto de la inducción de tolerancia isquémica y la NOR como estrategias terapéuticas para el tratamiento del glaucoma experimental.

Los resultados obtenidos indican que una aplicación semanal de pulsos de 5 minutos de isquemia retiniana, que careció de efectos per se, redujo las alteraciones funcionales e histológicas inducidas por la hipertensión ocular crónica provocada por inyecciones semanales de CS. La protección de la retina inducida por pulsos de isquemia fue independiente de la hipertensión ocular, como lo sugiere el hecho de que los pulsos de isquemia no afectaron el aumento de la PIO inducido por las inyecciones de CS.

El glaucoma humano de ángulo abierto es una neuropatía óptica progresiva. Análogamente a lo descripto respecto al modelo de glaucoma inducido por AH, también en el modelo inducido por CS hemos identificado diferentes etapas con las siguientes características: i) 3 semanas de la hipertensión ocular: **hipertensión ocular asintomática**, ii) 6 semanas de la hipertensión ocular: **glaucoma moderado** y iii) 10 semanas de la hipertensión ocular: **glaucoma avanzado**. Con el fin de evaluar si la inducción de la tolerancia isquémica es capaz de reducir la progresión del glaucoma, la aplicación de pulsos de isquemia comenzó a las 6 semanas de tratamiento con CS, un intervalo en el que las alteraciones funcionales ya son evidentes.

La aplicación semanal de pulsos de isquemia, evitó la disminución de la amplitud de las ondas a y b del ERG y de la amplitud del componente N2-P2 del VEP inducida por la hipertensión ocular crónica, avalando el concepto de que la inducción de la tolerancia isquémica no sólo preservó la función retiniana, sino también la actividad de todas las células en la vía desde los fotorreceptores hasta la corteza visual, incluyendo CGR y sus axones.

Además de las CGR, la CCG está compuesta por un número de células amácrinas desplazadas. NeuN es una proteína de unión al ADN que identifica en su mayoría a poblaciones neuronales maduras y que ha sido utilizada como un marcador específico de CGR (Buckingham y col., 2008; Canola y col., 2007; Dijk y col., 2007), mientras que Thy-1 es una glicoproteína de superficie que se expresa exclusivamente en las CGR. En la retina de los ojos inyectados con CS sin pulsos de isquemia, se observó una pérdida significativa de células en la CCG, como se muestra en los cortes teñidos con H&E o DAPI. También se observó una disminución de células inmunomarcadas con NeuN y Thy-1, sin cambios en el espesor de las distintas capas de la retina. Estas caídas fueron diferentes entre sí. La aplicación semanal de pulsos breves de isquemia redujo significativamente el efecto de la hipertensión ocular crónica sobre el número de células en la CCG, así como en el número de células apoptóticas localizadas en esta capa. Además, la inducción de tolerancia isquémica redujo significativamente la disminución en el número de axones del nervio óptico.

Aunque la influencia de la duración y frecuencia de los pulsos de isquemia en la protección de la retina merecería ser examinada con mayor detalle, estos resultados indican que con las condiciones experimentales utilizadas en este trabajo, se logró una protección significativa frente a las alteraciones retinianas provocadas por la hipertensión ocular crónica.

Múltiples pruebas experimentales sugieren que el daño glaucomatoso puede involucrar un componente isquémico (Flammer y col., 2002; Yamamoto y Kitazawa., 1998). El pre-condicionamiento isquémico (PCI) y el post-condicionamiento (PostC) son estrategias altamente

eficaces para proteger a la retina y a muchos otros tejidos frente a un episodio isquémico agudo y deletéreo. Sin embargo, al presente no se dispone de ningún antecedente sobre la posibilidad de inducir protección frente a un daño crónico a través de la aplicación de estímulos condicionantes. Un número considerable de enfermedades (visuales y no visuales) involucra componentes isquémicos subumbrales o moderados, pero sostenidos en el tiempo. En este sentido, los resultados obtenidos en esta Tesis constituyen la primera evidencia experimental que avala la posibilidad de inducir una protección isquémica que se prolongue en el tiempo, lo que permitiría amplificar en forma considerable la potencialidad terapéutica de este recurso, que podría inducir reacciones adaptativas a nivel celular que permitan establecer lo que podría denominarse un "fenotipo de protección latente", protegiendo al tejido frente al daño isquémico crónico. Quedan aún por elucidar los mecanismos responsables de la protección de la retina contra el daño glaucomatoso inducida por los pulsos de isquemia. Existen varios mecanismos comunes en la patogenia del daño isquémico y del daño glaucomatoso. En este sentido, el estrés oxidativo, la excitotoxicidad, la acidosis celular, la inflamación y otros mecanismos, posiblemente actuando en tándem, constituyen fenómenos relevantes tanto en la isquemia retiniana como en el glaucoma y de hecho, entre todos los tipos celulares retinianos, las CGR son las más susceptibles al daño isquémico y glaucomatoso (Quigley, 1999). Como ya se mencionó, diversas evidencias apoyan la hipótesis de que el daño oxidativo desempeña un papel clave en el daño glaucomatoso (Moreno y col., 2004; Tezel, 2006). Los resultados obtenidos en esta Tesis, indican que la hipertensión ocular inducida por inyecciones crónicas de CS aumentó la peroxidación lipídica retiniana y que la inducción de tolerancia isquémica disminuyó este parámetro. Por lo tanto, sin excluir la activación de otras vías de transducción asociadas al PCI en la retina, como la adenosina, los canales mitocondriales de K^+ dependientes de ATP, la proteína quinasa C, las proteínas de shock térmico y el NO (Roth, 2004; Li y col., 2000; Sakamoto y col., 2001), entre otras, y en base al hecho de que los pulsos de isquemia evitaron el aumento en la peroxidación

lipídica, es posible postular que la inducción de tolerancia isquémica podría comportarse como una terapia antioxidante.

Si bien una isquemia breve constituye el estímulo prototípico del PCI, es posible inducir tolerancia isquémica por la exposición de animales o células a diversos tipos de estímulos endógenos o exógenos que no son necesariamente de naturaleza isquémica, como la oxigenación hiperbárica (Yu y col., 2005) o la hipertermia (Kwong y col., 2003) entre otros, de forma tal que un determinado estresor puede inducir "tolerancia cruzada" respecto a un estresor de distinta naturaleza. En nuestro laboratorio, se ha demostrado que una inflamación moderada inducida por una única inyección intravítrea de lipopolisacárido bacteriano provee una protección retiniana significativa contra la lesión por isquemia/reperfusión (Franco y col., 2008). De hecho, el PCI también induce protección en la retina frente a un insulto no isquémico, como por ejemplo el daño por luz intensa (Casson y col., 2003). Se ha propuesto que la tolerancia isquémica provoca la atenuación de una gran variedad de mecanismos que inducen daño, incluyendo la excitotoxicidad, el desequilibrio iónico, el estrés oxidativo y nitrosativo, la disfunción metabólica, la inflamación y finalmente la muerte celular por necrosis o apoptosis (revisado en Gidday, 2006). Varios de estos mecanismos han sido involucrados en el daño glaucomatoso. Por lo tanto, aunque los resultados obtenidos no apoyan necesariamente la participación de daño isquémico en el glaucoma, estos resultados indican que la inducción de la tolerancia isquémica provee protección contra el daño glaucomatoso. Muchos agentes químicos suministrados de forma exógena (por ejemplo citoquinas inflamatorias, anestésicos e inhibidores metabólicos), también pueden inducir tolerancia isquémica, lo que permite prever que en un futuro próximo el PCI y el PostC podrían ser inducidos farmacológicamente (revisado en Gidday, 2006). Por lo tanto, estos resultados indican que la inducción de tolerancia isquémica podría constituir una nueva estrategia terapéutica para el tratamiento del glaucoma.

La NOR es uno de varios intentos para tratar quirúrgicamente la oclusión de la vena central de la retina (OVCR). A pesar de los resultados alentadores iniciales, este procedimiento aún es controversial y resulta necesario realizar estudios en animales de laboratorio para comprobar su eficacia, examinar los mecanismos involucrados y analizar los posibles efectos adversos. Los experimentos realizados en este trabajo tuvieron como primer objetivo analizar las consecuencias tempranas tanto funcionales como histológicas de este procedimiento en ojos de rata normal (sin OVCR), considerando el conjunto de evidencias que cuestionan este procedimiento quirúrgico esencialmente por los efectos colaterales de la cirugía per se. La NOR realizada en el ojo de un cadáver humano resultó en una lisis del canal escleral en la cabeza del nervio óptico (Altaweel y col., 2007). En ojos de rata, la NOR provocó sólo pequeños cambios histopatológicos, incluyendo un defecto menor en la lámina cribosa y en el anillo escleral que rodea al nervio óptico que no afectó significativamente las funciones oculares. En todos los intervalos estudiados, no se observaron lesiones en la vena ni en la arteria central de la retina, ni se observó una hemorragia vítrea significativa. Tampoco se observaron otras complicaciones de consideración, como la perforación del globo ocular o desprendimiento de retina. La respuesta de cicatrización de la herida post-NOR en ratas evolucionó más rápidamente que la descripta en ojos de cerdo (Czajka y col., 2004). Sin embargo, los hallazgos observados a nivel histopatológico mostraron una apariencia similar de la cicatriz tanto en ratas como en cerdos, con una leve pérdida de axones distales al sitio de la neurotomía, representados por haces de fibras irregulares y un posible aumento en la glía interaxonal.

Al presente, ningún estudio ha analizado efectos tempranos de la NOR sobre las funciones visuales en ojos de animales. Para evaluar la función de la retina, se registraron ERGs escotópicos en ojos con operación simulada o NOR. Se observó sólo una pequeña (pero significativa) disminución en la amplitud de las ondas a y b del ERG en los ojos sometidos a NOR, en comparación con los ojos con operación simulada a las 24 horas, mientras que 3 ó 7

días post-cirugía no se observaron diferencias entre los grupos experimentales. Los cambios transitorios y reversibles en el ERG se correlacionaron con los hallazgos histopatológicos y se hicieron evidentes sólo después de un corto período después de la cirugía (a las 24 h). Estos resultados indican que la NOR no afectó la función de la vía visual, lo que avala la idea de que esta operación en ratas no provocó daño en las fibras del nervio óptico, en contraste con lo descripto en algunos estudios de NOR en humanos (Vogel y col., 2006). Además, no se observaron cambios en el reflejo pupilar aferente o eferente o en la PIO en los ojos sometidos a NOR.

Un aspecto central en cuanto a la relevancia de estos hallazgos reside en las diferencias entre el ojo de la rata y el ojo humano. Aunque resultados de algunos autores indican que la lámina cribosa en el ojo de rata es delgada y poco desarrollada (Johansson, 1983), el ojo de rata es ampliamente reconocido como un buen modelo para estudios oftalmológicos, debido a que su anatomía es similar a la del ojo humano. De hecho, se demostró que la cabeza del nervio óptico de la rata posee una lámina cribosa con proteínas estructurales casi idénticas a la de los primates. (Morrison y col., 1995, Albrecht May, 2008). Por el contrario, otros modelos animales, por ejemplo conejo, pollo o codorniz, no resultan adecuados para el estudio de la lámina cribosa debido a la mielinización de los axones en la región de la lámina, lo que cambia drásticamente la composición celular y la reactividad mecánica de esta estructura. Además, la retina de estas especies es avascular, lo que probablemente tiene una gran influencia en el suministro de sangre a nivel de la cabeza del nervio óptico. (Albrecht May, 2008)

En la rata, la arteria central de la retina (ACR) deriva de una rama de la arteria oftálmica antes de su ramificación en las arterias ciliares posteriores. En la arteria oftálmica se encuentra regularmente presente una forma de V intra-arterial, justo antes de la bifurcación de la ACR, que podría influir en el flujo vascular de esta región (May y Lütjen-Drecoll, 2002; Lassmann y col., 1972; Bisaria y Sud, 1977). La ACR se extiende hacia la esclera y entra en el nervio óptico de

forma oblicua a nivel de la esclera y la coroides hacia el centro de la cabeza del nervio óptico, donde se ramifica aún más, formando las arterias retinianas. Los vasos centrales de la retina de los primates se derivan de una arteria central de la retina y una vena central de la retina (VCR). La ACR proviene de la arteria oftálmica y entra en el nervio óptico posteriormente a la lámina cribosa. La VCR se extiende paralelamente a la arteria, a través de la lámina cribosa. Ambas ramas vasculares se encuentran en el centro de la cabeza del nervio óptico formando los vasos retinianos principales. Por lo tanto, se debe tomar en cuenta el aporte vascular y la localización de los vasos centrales de la retina de rata al comparar los resultados con los estudios realizados en humanos. Aún con estas diferencias, estos animales de laboratorio de bajo costo, pueden ser útiles como modelos para comprender el comportamiento de la lámina cribosa. Principalmente debido al pequeño tamaño de los ojos de la rata, fue necesario un entrenamiento intensivo con el fin de optimizar el procedimiento quirúrgico. Sin embargo, después de este entrenamiento, hemos logrado obtener resultados reproducibles, tanto a nivel funcional como histológico. Todavía no nos encontramos en condiciones de establecer si efectivamente la NOR permite la descompresión de la vena central de la retina por medio de la creación de un espacio perivascular en la lámina cribosa. Por otra parte, los efectos de la NOR podrían ser diferentes en ojos isquémicos y en los no isquémicos. Sin embargo, estos resultados, constituyen el primer estudio de los efectos histológicos y funcionales de la NOR e indican que en ojos normales de ratas, esta cirugía provoca sólo pequeños cambios funcionales e histológicos.

Ahora bien, habiendo demostrado que la NOR sólo provocó alteraciones menores en ojos de ratas control, se consideró de interés analizar el efecto de esta maniobra quirúrgica en el modelo de glaucoma experimental inducido por CS. Para ello, y sobre la base de las consideraciones ya mencionadas en lo concerniente al estudio del efecto de la melatonina, en primer lugar se evaluó el efecto preventivo de la NOR sobre el daño glaucomatoso, realizando la cirugía a las 3 semanas de tratamiento con CS. Por primera vez, los resultados obtenidos indican que la NOR, que no

provocó ningún efecto per se, previno las alteraciones funcionales e histológicas inducidas por la hipertensión ocular crónica en el ojo de rata. La protección de la retina inducida por NOR fue independiente de la hipertensión ocular, dado que no se afectó el aumento de la PIO inducido por las inyecciones de CS. Una vez demostrado el efecto preventivo de la cirugía y considerando las limitaciones traslacionales de estos resultados, en la siguiente serie de experimentos, se examinó si la NOR no sólo es capaz de prevenir, sino también de reducir la neuropatía glaucomatosa. Para ello, la NOR se realizó a las 6 semanas de tratamiento con CS, un intervalo caracterizado por alteraciones funcionales significativas. Los presentes resultados indican que aún a las 6 semanas de la hipertensión ocular la NOR indujo una protección contra el daño glaucomatoso experimental, tanto a nivel funcional como histológico, similar a la observada en los ojos sometidos a NOR en una fase asintomática de hipertensión ocular (es decir, a las 3 semanas de tratamiento). La NOR realizada a las 3 y 6 semanas de hipertensión ocular previno y atenuó (respectivamente) en forma parcial la disminución de las amplitudes de las ondas a y b del ERG y previno y redujo en forma total, respectivamente, la disminución de la amplitud del componente N2-P2 del VEP inducida por inyecciones semanales de CS. No se dispone de una interpretación clara respecto a la protección parcial en el ERG y total en los VEPs. Sin embargo, la diferencia en la sensibilidad de ambos estudios podría constituir un factor clave en este sentido. A nivel histológico, la NOR también confirió neuroprotección a niveles de la CCG, demostrada por los resultados obtenidos con la tinción de H&E, DAPI y los marcadores específicos de CGR (NeuN, Thy-1 y Brn3a). En retinas de ojos inyectados con CS y sometidos a una operación simulada se observó una disminución en los niveles de estos marcadores. Esta disminución se redujo significativamente en ojos hipertensos sometidos a NOR, tanto a las 3 como a las 6 semanas de tratamiento. La protección inducida por la NOR en ambos intervalos fue también evidente a nivel del nervio óptico. Además, la disminución en el número de axones en los animales tratados con CS con operación simulada no fue evidente en los ojos sometidos a

NOR. Considerando la eventual relevancia que tendría en la Oftalmología Clínica el desarrollo de un nuevo abordaje quirúrgico para el tratamiento del glaucoma, se consideró necesario validar las ventajas terapéuticas de la NOR en otro modelo de glaucoma experimental previamente desarrollado por otros autores (Shareef y col. 1995) y ampliamente validado (Garcia-Valenzuela y col. 1995; Mittag y col. 2000; Grozdanic y col. 2003; Wang y col. 2005), que consiste en la cauterizaron de tres venas epiesclerales. Este modelo difiere considerablemente del modelo de glaucoma inducido por CS. En particular, en concordancia con lo descripto por otros autores, la cinética de las alteraciones retinianas es más rápida que la observada en el modelo de CS y por tal motivo, los intervalos en los que se realizó la NOR y los intervalos de evaluación de sus efectos fueron más tempranos. En este modelo, la hipertensión ocular no es resultado de una alteración trabecular sino post-trabecular, lo que podría constituir un escenario diferente en lo que respecta a las consecuencias de esta manipulación sobre las funciones visuales. Sin embargo, también en este caso se demostró que la NOR previno y atenuó significativamente el daño funcional e histológico provocado por la hipertensión ocular inducida por la cauterización de las venas epiesclerales, lo que representa un aval adicional a las ventajas terapéuticas de esta cirugía. Los mecanismos responsables de la neuroprotección de la retina contra el daño glaucomatoso inducida por NOR aún no se conocen. Durante los últimos 30 años, persiste un activo debate sobre la génesis del daño de los axones localizados dentro de la lámina cribosa. En particular, la controversia se ha centrado en si la PIO (hipótesis mecánica) o el suministro de sangre en la cabeza del nervio óptico (hipótesis vascular) es responsable del daño axonal en esta enfermedad. Sin embargo, los estudios de la anatomía de la lámina cribosa y la esclera peripapilar, indican que los eventuales efectos mecánicos y los componentes vasculares se encuentran inseparablemente interconectados entre sí en el daño glaucomatoso. Por ejemplo, previo al daño estructural de la cabeza del nervio óptico, el daño provocado puramente por la PIO podría afectar negativamente el suministro de sangre a los segmentos de la lámina de los axones a través de la

deformación del tejido conectivo que contiene los capilares. Además, el aumento de la PIO podría remodelar la matriz extracelular de la lámina cribosa afectando el transporte de nutrientes a las CGR. Por otro lado, la insuficiencia primaria en el suministro de sangre a la región laminar podría inducir cambios en el tejido conectivo de la lámina cribosa, debilitando a esta estructura y haciéndola más propensa a dañarse frente a un estrés mecánico inducido por el aumento de la PIO (Roberts y col., 2010). Además, se ha demostrado que un daño local en la lámina podría alterar el transporte axonal retrógrado de factores tróficos desde el colículo superior (principal área de proyección retiniana), tanto en humanos como en modelos de glaucoma experimental (Anderson y Hendrickson, 1974, Quigley y Anderson, 1976, 1977; Minckler y col., 1977).

Si bien la idea original de la NOR fue descomprimir la presión en la cabeza del nervio óptico producto de la OVCR, los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral sugieren que la relajación del anillo escleral en la region prelaminar y laminar de la cabeza del nervio óptico podría aliviar la presión en el tejido conectivo, que a su vez, podría prevenir la aparición y atenuar la neuropatía glaucomatosa, manteniendo la integridad estructural, el suministro de oxígeno y de nutrientes y recuperar el correcto transporte axonal, de forma de evitar la pérdida de fibras nerviosas en ojos hipertensos. Se ha postulado que el estrés relacionado con la PIO no sólo provoca cambios en el tejido conectivo de la lámina cribosa sino también alteraciones en los componentes celulares de este tejido, incluyendo astrocitos, células gliales y endoteliales y pericitos, junto con su membrana basal y axones de la cabeza del nervio óptico (Burgoyne y col., 2004). En la actualidad, no hemos podido determinar si existe un tipo celular específico como blanco de los efectos de la NOR, aspecto que se planea analizar en un futuro próximo.

En conjunto, los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral indican que un tratamiento crónico con melatonina, la inducción de tolerancia isquémica y la NOR proveen una protección altamente significativa tanto a nivel histológico como funcional contra el daño retiniano inducido por glaucoma experimental.

Consecuencias conceptuales de los resultados y perspectivas futuras

La Oftalmología Experimental constituye un área de vacancia en el panorama científico nacional. Si bien existen en nuestro país algunos grupos de investigación básica dedicados al estudio de diversos aspectos de la Fisiopatología Ocular, así como un alto nivel de desarrollo en Oftalmología Clínica, no se dispone al presente de una interfase básico-clínica fluida que permita encarar esta temática en forma integral. En este sentido, el presente proyecto ha contribuido a cimentar una sólida colaboración entre investigadores básicos y profesionales de trayectoria en la práctica clínica oftalmológica, que permitió encarar problemáticas oftalmológicas trascendentes, en particular, el glaucoma. Aunque no se dispone de estadísticas actualizadas en nuestro país, el glaucoma es, probablemente, una de las enfermedades que más frecuentemente requieren tratamiento oftalmológico. Un aspecto de particular interés que surge de los resultados obtenidos en esta Tesis es el hecho de que los posibles mecanismos protectors involucrados en las tres estrategias que resultaron exitosas para el tratamiento del glaucoma experimental difieren considerablemente entre sí. La hipótesis del uso de melatonina se basó en antecedentes del grupo y de otros autores que demuestran que la melatonina: 1) es un potente inhibidor del sistema nitrérgico retiniano, 2) es un antioxidante retiniano, 3) aumenta significativamente el clearance de glutamato sináptico y 4) es un activador del sistema GABAérgico. Considerando que el aumento en los niveles de NO, el daño oxidativo, la excitoxicidad glutamatérgica y el déficit del sistema GABAérgico podrían constituir factores causales de la neuropatía glaucomatosa, la hipótesis sobre la potencialidad terapéutica del tratamiento con melatonina se basó, precisamente, en que la reducción de al menos algunos de los mecanismos patogénicos involucrados en la enfermedad, podría prevenir y/o evitar el daño glaucomatoso. Esta hipótesis adquiere un aval adicional dada la demostración de una disminución significativa en los niveles retinianos de melatonina en el modelo de glaucoma inducido por AH (Moreno y col., 2004).

El estudio de los efectos de la tolerancia isquémica, en cambio, se fundamentó en otro aspecto de la enfermedad que dispone de considerable aval experimental, como es el componente vascular asociado a la hipertensión ocular. En este caso, se consideró que la viabilidad de esta hipótesis implicaría la efectividad de un tratamiento esencialmente dirigido a reducir los efectos deletéreos de la isquemia. Finalmente, la elección de la NOR se fundamentó en otro concepto fundante del daño glaucomatoso, que es la compresión a nivel de la lámina cribosa inducida por la hipertensión ocular crónica. De esta forma, la NOR podría proveer una descompresión quirúrgica en la región del ojo más susceptible a los efectos de la hipertensión ocular. En este contexto, una conclusión inmediata que surge de este análisis es que el glaucoma es una patología compleja con diversos factores de riesgo, y que la posibilidad de interferir con estos factores provee neuroprotección. Todavía no estamos en condiciones de aventurar el grado de relación entre estos "generadores" eventualmente diferentes de daño retiniano, pero considerando que todas las estrategias mencionadas proveyeron un alto grado de protección tanto funcional como histológica, parece posible que los efectores de daño puedan converger en un mecanismo final común de inducción de muerte celular. Se representa en la Figura 73 un esquema representativo de las diferentes estrategias terapéuticas examinadas en esta Tesis Doctoral y los presuntos niveles de acción de cada una de ellas en el marco del daño retiniano inducido por la hipertensión ocular crónica.

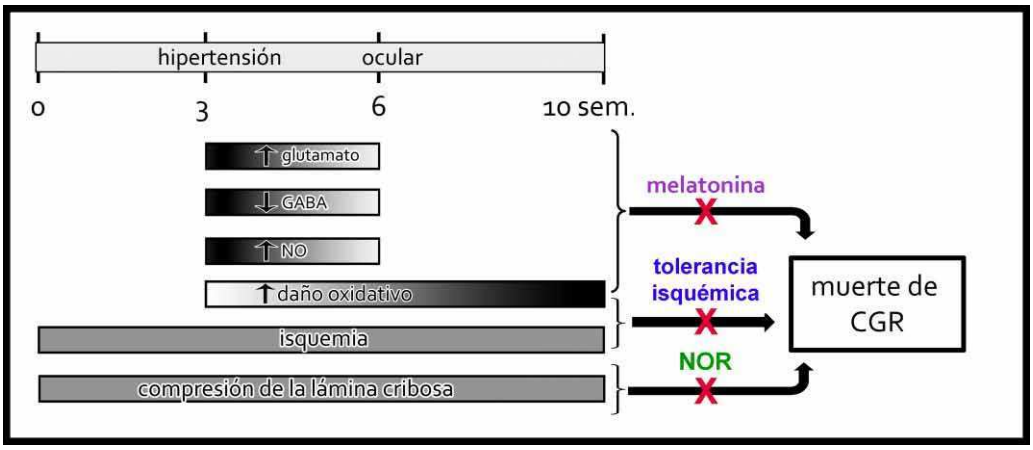

Figura 73. Representación esquemática de los efectos de la hipertensión ocular

crónica y las diferentes estrategias terapéuticas examinadas en esta Tesis. En trabajos previos se demostró un aumento en los niveles sinápticos de glutamato y en el daño oxidativo, así como un déficit en la actividad del sistema GABAérgico retiniano en ojos con hipertensión ocular. Los resultados de esta Tesis demostraron un aumento en la actividad del sistema nitrérgico en ojos hipertensos. Asimismo, los resultados obtenidos indican que la melatonina reguló los sistemas glutamatérgico, GABAérgico, nitrérgico, y el daño oxidativo de manera opuesta a la hipertensión ocular. La tolerancia isquémica previno el daño oxidativo y probablemente redujo el efecto deletéreo de la isquemia asociados a la hipertensión ocular crónica. La NOR presumiblemente redujo la compresión de la lámina cribosa inducida por la hipertensión ocular.

Probablemente resulte tan necesario como complejo analizar comparativamente las distintas estrategias terapéuticas examinadas en esta Tesis Doctoral y, eventualmente, intentar definir las ventajas comparativas de cada una de ellas respecto a las otras. Indudablemente, cada una ofrece ventajas y desventajas. En todo caso, cabe señalar que ninguna de las tres estrategias analizadas evitó completamente todas las alteraciones funcionales e histológicas inducidas por la hipertensión ocular crónica, lo que abre una perspectiva futura sobre la posibilidad de combinarlas de determinadas maneras, con la hipótesis de que las ventajas de cada una se sumen holísticamente en el beneficio terapéutico. Además, es necesario aclarar que en el transcurso de esta Tesis, hemos ido gradualmente incorporando más y mejores herramientas para evaluar tanto el daño glaucomatoso como la terapéutica y por ello, no existe simetría total en la evaluación de los beneficios eventuales de cada una de las terapias analizadas. Sin embargo, las tres maniobras terapéuticas examinadas en esta Tesis demostraron una protección significativa frente al daño glaucomatoso, en mayor o menor medida según la estrategia, el momento de su aplicación y el parámetro analizado.

La terapéutica contemporánea para el tratamiento del glaucoma está esencialmente destinada a disminuir la PIO. El tratamiento farmacológico clásico que es el más frecuente, consiste en colirios hipotensores oculares que se aplican una o varias veces al día y se deben mantener indefinidamente. Este tratamiento es oneroso, dado que la medicación es costosa en sí misma y además debe aplicarse en forma crónica. Además, estos colirios pueden producir reacciones

adversas, locales o generales, que en muchos casos requieren la interrupción inmediata del tratamiento. Asimismo, como ya se mencionó, 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. En esta Tesis hemos demostrado que la protección retiniana frente al daño glaucomatoso obtenida con las tres estrategias analizadas fue independiente de la PIO, lo que podría considerarse un aval adicional en contra del rol excluyente de la hipertensión ocular como factor único de daño retiniano. En función de los resultados obtenidos, es posible postular que la hipertensión ocular constituye una señal inicial que desencadena mecanismos deletéreos, que son últimamente responsables del daño y que pueden ser "tratados" independientemente del factor que los desencadenó (es decir el aumento de la PIO). Estos resultados y trabajos de otros autores han estimulado la búsqueda activa de terapias de nueva generación que aspiran a incluir neuroprotectores que puedan ser utilizados como herramientas complementarias con otros medicamentos diseñados para disminuir el insulto inicial (esencialmente hipotensores oculares).

Si bien en el marco de esta Tesis hemos contestado algunos interrogantes, los resultados obtenidos abren un número de cuestionamientos, quizás aún mayor que los que logramos responder. Indudablemente el aspecto pendiente más complejo es la eventual aplicabilidad clínica de los resultados obtenidos. En este sentido, al menos el tratamiento crónico con melatonina, que probadamente carece de efectos tóxicos aún en altas concentraciones podría ser de transferencia práctica a la clínica para su uso en humanos, con todas las particularidades y recaudos del caso. En cuanto a la tolerancia isquémica como estrategia terapéutica, las perspectivas futuras incluyen la elucidación de los mecanismos celulares y moleculares involucrados que podría fundamentar el marco conceptual necesario para desarrollar terapias de nueva generación destinadas a reproducir los efectos protectores con agentes farmacológicos o eventualmente, una estrategia de terapia génica que permita mantener a la retina en un estado "defensivo" (condicionado) sostenido. Con respecto a la NOR, aun considerando los recaudos

necesarios al extrapolar datos obtenidos en roedores a humanos, los resultados obtenidos proporcionan evidencias que respaldan los beneficios de esta cirugía frente al daño retiniano inducido por hipertensión ocular crónica. En este caso, debe prestarse particular atención al hecho de que el sustrato anatómico de la cirugía es la cabeza del nervio óptico, una estructura muy delicada y crucial. Sin embargo, es esperable que la evolución de las técnicas y la tecnología pueda aumentar el margen de seguridad y la eficacia de la NOR en humanos, lo que permite prever que en el futuro, los beneficios de la NOR contra el daño glaucomatoso podrían ser mayores que los riesgos de este procedimiento.

El glaucoma es una enfermedad invalidante porque en estados avanzados produce ceguera total e irreversible. La posibilidad de desarrollar con éxito nuevas estrategias terapéuticas podría beneficiar a toda la población que padece esta enfermedad, así como a su entorno familiar y social. Si bien quedan aún muchos aspectos por analizar, el conjunto de resultados obtenidos en esta Tesis podrían contribuir a responder algunos de los grandes interrogantes que quedan aún sin resolver en la etiopatogenia del glaucoma y constituir, además, una futura avenida fértil para aumentar el espectro de recursos disponibles ante el desafío terapéutico que enfrentan los oftalmólogos en el tratamiento del glaucoma.

Epílogo

Dice (y con razón) el saber popular que hay dos formas de “ver el vaso”: medio lleno o medio vacío. En esta Tesis no obtuvimos evidencias en favor de una u otra de estas opciones, pero en cambio, hemos pretendido contribuir a mejorar la visión de aquellos que padecen por no tenerla, porque después de todo, parafraseando al poeta español Ramón de Campoamor: “Y es que en el mundo traidor, no hay verdad ni hay mentira: todo es según el color del cristal con que se mira”.

CONCLUSIONES

- La actividad de NOS aumentó significativamente, tanto a las 3 como a las 6 semanas de hipertensión ocular inducida por inyecciones semanales de AH, aunque no se observaron cambios en los niveles proteicos de las isoformas NOS-1,-2 y -3.

- La hipertensión ocular inducida por AH aumentó significativamente el influjo de L-arginina y los niveles de ARNm para los transportadores CAT-1 y CAT-2 en retinas de ojos hipertensos. Se observó un aumento significativo en la acumulación de GMPc a las 3 semanas, pero no a las 6 semanas de hipertensión ocular.

- En retinas control, la melatonina aumentó el uptake de glutamato, la actividad de la glutamina sintetasa, el turnover de GABA, la actividad de las enzimas glutamato descarboxilasa y superóxido dismutasa y los niveles de glutatión reducido y disminuyó la actividad de NOS, el uptake de L-arginina y la peroxidación lipídica retiniana.

- La melatonina, que no afectó la PIO, previno y disminuyó los efectos de la hipertensión ocular sobre la función retiniana (evaluada por electrorretinografía) y de la vía visual (evaluada a través de VEPs) y disminuyó la vulnerabilidad de las células localizadas en la CCG frente a los efectos deletéreos de hipertensión ocular crónica.

- Inyecciones semanales de condroitín sulfato (CS) produjeron un aumento significativo de la PIO que alcanzó un nivel de estado estacionario, similar al provocado por una inyección única de CS, que se prolongó a lo largo de la duración del estudio (10 semanas).

- Inyecciones semanales de CS indujeron una disminución significativa en la amplitud de las ondas a y b del ERG escotópico y de la onda N2-P2 de los VEPs, que fue evidente a partir de las 6 semanas de hipertensión ocular y progresó en períodos posteriores.

- Inyecciones crónicas de CS indujeron alteraciones significativas en la morfología de la retina limitadas a la CCG, que fue evidente a las 10 semanas de hipertensión ocular. Se observó una alteración de la forma de los axones y una disminución significativa en el número de axones, siendo los axones grandes más vulnerables que las fibras de diámetro pequeño.

- El condicionamiento isquémico, que no provocó cambios en la PIO, preservó las alteraciones electrorretinográficas en los ojos inyectados semanalmente con CS y evitó la caída en la amplitud del componente N2-P2 del VEP inducida por hipertensión ocular.

- La aplicación semanal de pulsos de isquemia preservó las alteraciones histológicas inducidas por hipertensión ocular. Se observó una disminución significativa en la caída en el número de CGR y y de células apoptóticas en las retinas de ojos inyectados con CS a las 10 semanas de tratamiento. Asimismo, se observó una preservación en el número de axones del nervio óptico en animales con hipertensión ocular.

- El condicionamiento isquémico evitó el aumento de la peroxidación lipídica retiniana inducido por inyecciones crónicas de CS.

- En ojos de rata normal, la neurotomía óptica radial (NOR) provocó alteraciones leves en la cabeza del nervio óptico y una disminución transitoria y reversible en el ERG. No se observaron cambios en los VEPs, la PIO y el reflejo pupilar en ojos de ratas sometidas a NOR.

- La NOR, que no afectó la PIO, disminuyó las alteraciones funcionales de las retinas con hipertensión ocular. La NOR realizada a las 3 ó 6 semanas de tratamiento con CS, previno y redujo respectivamente, los cambios en el ERG y VEPs inducidos por hipertensión ocular crónica.

- La NOR evitó la disminución en el número de células de la CCG observada en retinas de ojos con hipertensión ocular. La NOR aplicada tanto a las 3 como a las 6 semanas de tratamiento, previno y redujo respectivamente, la disminución en los niveles de Thy-1, NeuN y Brn3a inducida por hipertensión ocular.

- La disminución en el número de axones en el nervio óptico de ojos tratados con CS luego de 10 semanas fue prevenido o reducido por la aplicación de la NOR a las 3 ó 6 semanas de tratamiento, respectivamente.

- La aplicación de NOR en otro modelo experimental de glaucoma (inducido por la cauterización de las venas epiesclerales), indujo una preservación de la función retiniana (ERG) y de la vía visual (VEPs) En este modelo de glaucoma experimental se observó que la NOR previno y redujo la disminución en el número de células en la CCG en retinas de ojos hipertensos. La NOR no afectó la PIO inducida por la cauterización de las venas epiesclerales.

BIBLIOGRAFIA

- Abu-Amero KK, Morales J, Bosley TM. Mitochondrial abnormalities in patients with primary open-angle glaucoma. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2006;47:2533-41.

- Acott TS, Westcott M, Passo MS, Van Buskirk EM. Trabecular meshwork glycosaminoglycans in human and cynomolgus monkey eye. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1985; 26:1320-9.

- Aihara M, Lindsey JD, Weinreb RN. Aqueous humor dynamics in mice. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2003;44:5168-73.

- Aizenman E, Frosch MP, Lipton SA. Responses mediated by excitatory amino acid receptors in solitary retinal ganglion cells from rat. J Physiol. 1988;396:75-91.

- Albrecht May C. Comparative anatomy of the optic nerve head and inner retina in non-primate animal models used for glaucoma research. Open Ophthalmol J. 2008;2:94-101.

- Alder VA, Cringle SJ. The effect of the retinal circulation on vitreal oxygen tensión. Curr Eye Res. 1985;4:121-9.

- Altaweel MM, Freisberg L, Pal N, Gleiser J, Ryan EH, Dawson D, Albert D. Radial optic neurotomy using nasal and temporal approach incisions: histopathologic study in human cadaver eyes. Arch Ophthalmol. 2007;125:1553-7.

- Amara SG, Fontana ACK. Excitatory amino acid transporters: keeping up with glutamate, Neurochem Int. 2002;41:313-8.

- Anderson DR, Hendrickson A. Effect of intraocular pressure on rapid axoplasmic transport in monkey optic nerve. Invest Ophthalmol. 1974;13:771-83.

- Anderson MG, Smith RS, Hawes NL, Zabaleta A, Chang B, Wiggs JL, John SW. Mutations in genes encoding melanosomal proteins cause pigmentary glaucoma in DBA/2J mice. Nat Genet. 2002;30:81-5.

- Anderson SM, Swanson RA. Astrocyte glutamate transport: Review of properties, regulation, and physiological functions. Glia 2000;32:1-14.

- Andrade da Costa BL, de Mello FG, Hokoc JN. 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. 2000;863:132-142.

- Andrade da Costa BL, Hokoç JN. 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. 2003;20:153-63.

- Antolin I, Rodriguez C, Sainz RM, Mayo JC, Uria H, Kotler ML, Rodriguez-Colunga MJ, Tolivia D, Menendez-Pelaez A. Neurohormone melatonin prevents cell damage: effect on gene expression for antioxidant enzymes. FASEB J. 1996;10:882-90.

- Axelrod J. The pineal gland: a neurochemical transducer. Science 1974;184:1341-8.

- Bak LK, Schousboe A, Waagepetersen HS. The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. J Neurochem. 2006;98:641-53.

- Bal-Price A, Brown GC. Inflammatory neurodegeneration mediated by nitric oxide from activated glia-inhibiting neuronal respiration, causing glutamate release and excitotoxicity. J Neurosci. 2001;21:6480-91.

- Barany EH, Scotchbrook S. Influence of testicular hyaluronidase on the resistance to flow through the angle of the anterior chamber. Acta Physiol Scand. 1954; 30:240-8.

- Barlow-Walden LR, Reiter RJ, Abe M, Pablos M, Chen LD, Poeggeler B. Melatonin stimulates brain glutathione peroxidase activity. Neurochem Int. 1995;26:497-502.

- Bayer AU, Danias J, Brodie S, Maag KP, Chen B, Shen F, Podos SM, Mittag TW. Electroretinographic abnormalities in a rat glaucoma model with chronic elevated intraocular pressure. Exp Eye Res. 2001a;72:667-77.

- Bayer AU, Neuhardt T, May AC, Martus P, Maag KP, Brodie S, Lütjen-Drecoll E, Podos SM, Mittag T.. Retinal morphology and ERG response in the DBA/2NNia mouse model of angle-closure glaucoma. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2001b; 42:1258-65.

- Benozzi J, Jaliffa CO, Firpo Lacoste F, Llomovatte DW, Keller Sarmiento MI, Rosenstein RE. Effect of brimonidine on rabbit trabecular meshwork hyaluronidase activity. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2000;41:2268-72.

- Benozzi J, Nahum LP, Campanelli JL, Rosenstein RE. Effect of hyaluronic acid on intraocular pressure in rats. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2002;43:2196-200.

- Bernasconi R, Bittiger H, Heid J, Martin P. Determination of GABA levels by a [3H]-muscimol radioreceptor assay. J Neurochem. 1980;34:614-8.

- Bertilsson L, Mao CC, Costa E. Application of principles of steady-state kinetics to the estimation of gamma-aminobutyric acid turnover rate in nuclei of rat brain. J Pharmacol Exp Ther. 1977;200:277-84.

- Besharse JC, Dunis DA. Methoxyindoles and photoreceptor metabolism: activation of rod shedding. Science 1983;219:1341-3.

- Bettahi I, Pozo D, Osuna C, Reiter RJ, Acuña-Castroviejo D, Guerrero JM. Melatonin reduces nitric oxide synthase activity in rat hypothalamus. J Pineal Res. 1996; 20:205-10.

- Beutler E, Duron O, Kelly BM. Improved method for the determination of blood glutathione. J Lab Clin Med. 1963;61: 882-8.

- Bill A. A reply to R. Tripathi: uveoscleral drainage of aqueous humor. Exp Eye Res. 1977; 25 Suppl: 309-10.

- Bill A, Phillips CI. Uveoscleral drainage of aqueous humour in human eyes. Exp Eye Res. 1971;12:275-81.
- Bisaria KK, Sud SD. The central retinal artery in the albino rats (a histological study). Indian J Ophthalmol. 1977;24:23-6.

- Bishop A, Anderson JE. NO signaling in the CNS: from the physiological to the pathological. Toxicology 2005;15;208:193-205.

- Block, ER, Herrera H, Couch M. Hypoxia inhibits L-arginine uptake by pulmonary artery endothelial cells. Am J Physiol. 1995;269:574-80.

- Blute TA, Lee HK, Huffmaster T, Haverkamp S, Eldred WD. Localization of natriuretic peptides and their activation of particulate guanylate cyclase and nitric oxide synthase in the retina. J Comp Neurol. 2000;424:689-700.

- Bode BP. Recent molecular advances in mammalian glutamine transport. J Nutrition 2001;131, 2475S-85S.

- Bonomi L, Marchini G, Marraffa M, Bernardi P, De Franco I, Perfetti S, Varotto A, Tenna V. Prevalence of glaucoma and intraocular pressure distribution in a defined population. The Egna-Neumarkt Study. Ophthalmology 1998; 105:209-15.

- Bormann J. The 'ABC' of GABA receptors. Trends Pharmacol Sci. 2000;21:16-9.

- Brandstätter R. Encoding time of day and time of year by the avian circadian system. J Neuroendocrinol. 2003;15:398-404.

- Bredt DS, Glatt CE, Hwang PM, Fotuhi M, Dawson TM, Snyder SH. Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH diaphorase. Neuron 1991;7:615-24.

- Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. Annu Rev Biochem. 1994;63:175-95.

- Brenman JE, Bredt DS. Nitric oxide signaling in the nervous system. Methods Enzymol. 1996;269:119-29.

- Bröer S, Brookes N. Transfer of glutamine between astrocytes and neurons. J Neurochem. 2001;77:705-19.

- Brooks DE, Garcia GA, Dreyer EB, Zurakowski D, Franco-Bourland RE. Vitreous body glutamate concentration in dogs with glaucoma. Am J Vet Res. 1997;58:864-7.

- Bubenik GA, Brown GM, Uhlir I, Grota LJ. Immunohistological localization of N-acetylindolealkylamines in pineal gland, retina and cerebellum. Brain Res. 1974;81:233-42.

- Bubenik GA, Purtill RA, Brown GM, Grota LJ. Melatonin in the retina and the Harderian gland. Ontogeny, diurnal variations and melatonin treatment. Exp Eye Res. 1978;27:323-33.

- Buckingham BP, Inman DM, Lambert W, Oglesby E, Calkins DJ, Steele MR, Vetter ML, Marsh-Armstrong N, Horner PJ. Progressive ganglion cell degeneration precedes neuronal loss in a mouse model of glaucoma. J Neurosci. 2008;28:2735-44.

- Bunin AIa, Filina AA, Erichev VP. A glutathione deficiency in open-angle glaucoma and the approaches to its correction. Vestn Oftalmol. 1992;108:13-5.

- Burgoyne CF, Downs JC, Bellezza AJ, Hart RT. Three-dimensional reconstruction of normal and early glaucoma monkey optic nerve head connective tissues. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2004;45:4388-99.

- Cahill GM, Besharse JC. Retinal melatonin is metabolized within the eye of xenopus laevis. Proc Natl Acad Sci U S A. 1989;86:1098-102.

- Cahill GM, Besharse JC. Circadian clock functions localized in xenopus retinal photoreceptors. Neuron 1993;10:573-7.

- Canola K, Angénieux B, Tekaya M, Quiambao A, Naash MI, Munier FL, Schorderet DF, Arsenijevic Y. Retinal stem cells transplanted into models of late stages of retinitis pigmentosa preferentially adopt a glial or a retinal ganglion cell fate. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2007;48: 446-54.

- Cardinali DP, Rosner JM. Retinal localization of the hydroxyindole-O-methyl transferase (HIOMT) in the rat. Endocrinology 1971; 89:301-3.

- Carmo A, Cunha-Vaz JG, Carvalho AP, Lopes MC. L-arginine transport in retinas from streptozotocin diabetic rats: correlation with the level of IL-1 beta and NO synthase activity. Vision Res. 1999;39:3817-23.

- Carter-Dawson L, Crawford ML, Harwerth RS, Smith EL 3rd, Feldman R, Shen FF, Mitchell CK, Whitetree A. Vitreal glutamate concentration in monkeys with experimental glaucoma. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2002;43:2633-7.

- Casson RJ, Wood JP, Melena J, Chidlow G, Osborne NN. The effect of ischemic preconditioning on light-induced photoreceptor injury. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2003; 44:1348-54.

- Cassone VM, Warren WS, Brooks DS, Lu J. Melatonin, the pineal gland, and circadian rhythms. J Biol Rhythms. 1993;8 Suppl:S73-81.

- Cazevieille C, Safa R, Osborne NN. Melatonin protects primary cultures of rat cortical neurones from NMDA excitotoxicity and hypoxia/reoxygenation. Brain Res. 1997;768:120-4.

- Celebi S, Dilsiz N, Yilmaz T, Kukner AS. Effects of melatonin, vitamin E and octreotide on lipid peroxidation during ischemia-reperfusion in the guinea pig retina. Eur J Ophthalmol. 2002; 12:77-83.

- Cernea P. The resistance to drainage of the aqueous humor. Oftalmologia 1993;37:289-98.

- Chan WH, Yu JS, Yang SD. PAK2 is cleaved and activated during hyperosmotic shock-induced apoptosis via a caspase-dependent mechanism: evidence for the involvement of oxidative stress. J Cell Physiol. 1999;178:397-408.

- Chauhan BC, Pan J, Archibald ML, LeVatte TL, Kelly ME, Tremblay F. Effect of intraocular pressure on optic disc topography, electroretinography, and axonal loss in a chronic pressure-induced rat model of optic nerve damage. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2002;43:2969-76.

- Chiou GC, McLaughlin MA. Studies on the involvement of melatonergic mechanism in intraocular pressure regulation. Ophthalmic Res. 1984;16:302-6.

- Choong YF, Devarajan N, Pickering A, Pickering S, Austin MW. Initial management of ocular hypertension and primary open-angle glaucoma: an evaluation of the royal college of ophthalmologists' guidelines. Eye 2003; 17:685-9.

- Chun MH, Wassle H. GABA-like immunoreactivity in the cat retina: electron microscopy. J Comp Neurol. 1989;279:55-67.

- Chung SY, Han SH. Melatonin attenuates kainic acid-induced hippocampal neurodegeneration and oxidative stress through microglial inhibition. J Pineal Res. 2003; 34:95-102.

- Cioffi GA. Three common assumptions about ocular blood flow and glaucoma. Surv Ophthalmol. 2001;45 Suppl 3:S325-31; discussion S332-4.

- Closs EI, Albritton LM, Kim JW, Cunningham JM. Identification of a low affinity, high capacity transporter of cationic amino acids in mouse liver. J Biol Chem. 1993; 268:7538-44.

- Contini M, Raviola E. GABAergic synapses made by a retinal dopaminergic neuron. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003;100:1358-63.

- Cossenza M, Cadilhe DV, Coutinho RN, Paes-de-Carvalho R. Inhibition of protein synthesis by activation of NMDA receptors in cultured retinal cells: a new mechanism for the regulation of nitric oxide production. J Neurochem. 2006;97:1481-93.

- Cruickshanks KJ, Klein R, Klein BE. Sunlight and age-related macular degeneration. The Beaver Dam Eye Study. Arch Ophthalmol. 1993;111:514-8.

- Cuzzocrea S, Zingarelli B, Gilad E, Hake P, Salzman AL, Szabo C. 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. 1997; 23:106-16.

- Czajka MP, Cummings TJ, McCuen BW 2nd, Toth CA, Nguyen H, Fekrat S. Radial optic neurotomy in the porcine eye without retinal vein occlusion. Arch Ophthalmol. 2004;122:1185-9.

- Daubs JG, Crick RP. Effect of refractive error on the risk of ocular hypertension and open angle glaucoma. Trans Ophthalmol Soc U K. 1981;101:121-6.
- Davies JA, Fisher CE, Barnett MW. Glycosaminoglycans in the study of mammalian organ development. Biochem Soc Trans. 2001;29:166-71.

- Dawson TM, Steiner JP, Dawson VL, Dinerman JL, Uhl GR, Snyder SH. Immunosuppressant FK506 enhances phosphorylation of nitric oxide synthase and protects against glutamate neurotoxicity. Proc Natl Acad Sci. U.S.A. 1993; 90:9808-12.

- Delyfer MN, Simonutti M, Neveux N, Leveillard T, Sahel JA. Does GDNF exert its neuroprotective effects on photoreceptors in the rd1 retina through the glial glutamate transporter GLAST? Mol Vis. 2005;11:677-87.

- Dene BA, Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB 3rd. Effects of antioxidant treatment on normal and diabetic rat retinal enzyme activities. J Ocul Pharmacol Ther. 2005;21:28-35.

- Derouiche A, Rauen T. Coincidence of L-glutamate/L-aspartate transporter (GLAST) and glutamine synthetase (GS) immunoreactions in retinal glia: evidence for coupling of GLAST and GS in transmitter clearance. J Neurosci Res. 1995;42:131-43.

- Devés R., Boyd CA. Transporters for cationic amino acids in animal cells: discovery, structure, and function. Physiological Rev. 1998;78:487-545.

- Dijk F, Bergen AA, Kamphuis W. GAP-43 expression is upregulated in retinal ganglion cells after ischemia/reperfusion-induced damage. Exp Eye Res. 2007;84: 858-867.

- Ding Y, Li J, Luan X, Ding YH, Lai Q, Rafols JA, Phillis JW, Clark JC, Diaz FG. Exercise pre-conditioning reduces brain damage in ischemic rats that may be associated with regional angiogenesis and cellular overexpression of neurotrophin. Neuroscience 2004;124:583-91.

- Dkhissi O, Chanut E, Wasowicz M, Savoldelli M, Nguyen-Legros J, Minvielle F, Versaux-Botteri C. Retinal TUNEL-positive cells and high glutamate levels in vitreous humor of mutant quail with a glaucoma-like disorder. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1999;40:990-5.

- do Carmo A, Lopes C, Santos M, Proenca R, Cunha-Vaz J, Carvalho AP. Nitric oxide synthase activity and L-arginine metabolism in the retinas from streptozotocin-induced diabetic rats. Gen Pharmacol. 1998;30:319-324.

- do Nascimento JL, Ventura AL, Paes de Carvalho R. Veratridine- and glutamate-induced release of [3H]-GABA from cultured chick retina cells: possible involvement of a GAT-1-like subtype of GABA transporter. Brain Res. 1998;798:217-222.

- Dorey CK, Delori FC, Akeo K. Growth of cultured RPE and endothelial cells is inhibited by blue light but not green or red light. Curr Eye Res. 1990;9:549-59.

- Dowling JE. How the retina "sees." Invest Ophthalmol Vis Sci. 1978;17:832-4.

- Dowling JE. Information processing by local circuits: the vertebrate retina as a model system in the neuroscience. Fourh Study Program. Schmitt and Worden (eds.) 1979. Cambridge, Mass, MIT press.

- Dowling JE, Ehinger B. The interplexiform cell system. I. Synapses of the dopaminergic neurons of the goldfish retina. Proc R Soc Lond B Biol Sci. 1978;201:7-26.

- Drexler H, Zeiher AM, Meinzer K, Just H. Correction of endothelial dysfunction in coronary microcirculation of hypercholesterolaemic patients by L-arginine. Lancet 1991;338:1546-1550.

- Dreyer E, Zurakowski D, Schumer R. Elevated glutamate levels in the vitreous body of humans and monkeys with glaucoma. Arch Ophtalmol. 1996;114:299-305

- Dreyer EB, Grosskreutz CL. Excitatory mechanisms in retinal ganglion cell death in primary open angle glaucoma (POAG). Clin Neurosci. 1997;4:270-3.

- Du Y, Sarthy VP, Kern TS. Interaction between NO and COX pathways in retinal cells exposed to elevated glucose and retina of diabetic rats. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2004;287:R735-41.

- Duarte CB, Ferreira IL, Santos PF, Oliveira CR, Carvalho AP. Glutamate increases the [Ca2+]i but stimulates Ca(2+)-independent release of [3H]GABA in cultured chick retina cells. Brain Res. 1993;611:130-8.

- Dubocovich ML. Melatonin is a potent modulator of dopamine release in the retina. Nature 1983;306:782-4

- Dubocovich ML, Masana MI, Benloucif S. Molecular pharmacology and function of melatonin receptor subtypes. Adv Exp Med Biol. 1999;460:181-90.

- Ebadi M, Govitrapong P. Neural pathways and neurotransmitters affecting melatonin synthesis. J Neural Transm Suppl. 1986;21:125-55.

- Edmunds B, Thompson JR, Salmon JF, Wormald RP. The National Survey of Trabeculectomy. I. Sample and methods. Eye 1999;13 (Pt 4):524-30.

- Ehinger B, Falck B. Autoradiography of some suspected neurotransmitter substances: GABA glycine, glutamic acid, histamine, dopamine, and L-dopa. Brain Res. 1971;33:157-72.

- El-Remessy AB, Khalil IE, Matragoon S, Abou-Mohamed G, Tsai NJ, Roon P, Caldwell RB, Caldwell RW, Green K, Liou GI. Neuroprotective effect of (-) Delta9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol in N-methyl-D-aspartate-induced retinal neurotoxicity: involvement of peroxynitrite. Am J Pathol. 2003;163:1997-2008.

- Espinar A, Garcia-Oliva A, Isorna EM, Quesada A, Prada FA, Guerrero JM. Neuroprotection by melatonin from glutamate-induced excitotoxicity during development of the cerebellum in the chick embryo. J Pineal Res. 2000; 28:81-8.

- Faillace MP, Keller Sarmiento MI, Nicola Siri L, Rosenstein RE. Diurnal variations in cylic AMP and melatonin content of golden hamster retina. J Neurochem. 1994;62:1995-2000.

- Faillace MP, Cutrera R, Keller Sarmiento MI, Rosenstein RE. Evidence for local synthesis of melatonin in golden hamster retina. Neuroreport 1995;6:2093-5.

- Faillace MP, Keller Sarmiento MI, Rosenstein RE. Melatonin effect on 3H glutamate uptake and release in the golden hamster retina. J Neurochem. 1996a; 67:623-7.

- Faillace MP, Keller Sarmiento MI, Rosenstein RE. Daily variations in cGMP, guanylate cyclase and phosphodiesterase in the golden hamster retina. Vision Res. 1996b;36:1365-9.

- Fei PF, Yue BY, Tso MO. Effects of chronic intracameral injections of chondroitin sulfate on cat eyes. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 1984;222:1-8.

- Fernandez DC, Bordone MP, Chianelli MS, Rosenstein RE. Retinal neuroprotection against ischemia-reperfusion damage induced by postconditioning. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2009; 50:3922-30.

- Fine BS, Yanoff M, Stone RA. A clinicopathologic study of four cases of primary open-angle glaucoma compared to normal eyes. Am J Ophthalmol. 1981;91:88-105.

- Flammer J, Orgül S, Costa VP, Orzalesi N, Krieglstein GK, Serra LM, Renard JP, Stefánsson E. The impact of ocular blood flow in glaucoma. Prog Retin Eye Res. 2002;21:359-393.

- Franco PJ, Fernandez DC, Sande PH, Keller Sarmiento MI, Chianelli M, Sáenz DA, Rosenstein RE. Effect of bacterial lipopolysaccharide on ischemic damage in the rat retina. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2008; 49:4604-12.

- François J, Benozzi G, Victoria-Troncoso V, Bohyn W. Ultrastructural and morphometric study of corticosteroid glaucoma in rabbits. Ophthalmic Res. 1984;16:168-78.

- Fujieda H, Hamadanizadeh SA, Wankiewicz E, Pang SF, Brown GM. Expression of mt1 melatonin receptor in rat retina: evidence for multiple cell targets for melatonin. Neuroscience 1999;93:793-9.

- Garbarino-Pico E, Carpentieri AR, Contin MA, Sarmiento MI, Brocco MA, Panzetta P, Rosenstein RE, Caputto BL, Guido ME. Retinal ganglion cells are autonomous circadian oscillators synthesizing N-acetylserotonin during the day. J Biol Chem. 2004;279:51172-81.

- Garcia-Valenzuela E, Shareef S, Walsh J, Sharma SC. Programmed cell death of retinal ganglion cells during experimental glaucoma. Exp Eye Res. 1995; 61:33-44.

- Gern WA, Ralph CL. Melatonin synthesis by the retina. Science 1979;204:183-4.

- Gidday JM. Cerebral preconditioning and ischaemic tolerance. Nat Rev Neurosci. 2006; 7:437-48.

- Glovinsky Y, Quigley HA, Dunkelberger GR. Retinal ganglion cell loss is size dependent in experimental glaucoma. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1991;32:484-91.

- Gorovits R, Avidan N, Avisar N, Shaked I, Vardimon L. Glutamine synthetase protects against neuronal degeneration in injured retinal tissue. Proc Natl Acad Sci. 1997;94:7024-9.

- Grace MS, Cahill GM, Besharse JC. Melatonin deacetylation: retinal vertebrate class distribution and Xenopus laevis tissue distribution. Brain Res. 1991;559:56-63.

- Granfeldt A, Lefer DJ, Vinten-Johansen J. Protective ischaemia in patients: preconditioning and postconditioning. Cardiovasc Res. 2009;83:234-46.

- Green WR, Chan CC, Hutchins GM, Terry JM. Central retinal vein occlusion: a prospective histopathologic study of 29 eyes in 28 cases. Trans Am Ophthalmol Soc 1981;79:371-422.

- Grima G, Cuenod M, Pfeiffer S, Mayer B, Do KQ. Arginine availability controls the N-methyl-D-aspartate-induced nitric oxide synthesis: involvement of a glial-neuronal arginine transfer. J Neurochem. 1998;71:2139-44.

- Grippo TM, Hood DC, Kanadani FN, Ezon I, Greenstein VC, Liebmann JM, Ritch R. A comparison between multifocal and conventional VEP latency changes secondary to glaucomatous damage. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2006;47:5331-5336.

- Grota LJ, Brown GM. Antibodies to indolealkylamines: serotonin and melatonin. Can J Biochem. 1974;52:196-202.

- Grozdanic SD, Betts DM, Sakaguchi DS, Kwon YH, Kardon RH, Sonea IM. Temporary elevation of the intraocular pressure by cauterization of vortex and episcleral veins in rats causes functional deficits in the retina and optic nerve. Exp Eye Res. 2003;77:27-33.

- Hardeland R. Antioxidative protection by melatonin: multiplicity of mechanisms from radical detoxification to radical avoidance. Endocrine 2005;27:119-130.

- Harooni M, Freilich JM, Abelson M, Refojo M. Efficacy of hyaluronidase in reducing increases in intraocular pressure related to the use of viscoelastic substances. Arch Ophthalmol. 2000;118:445-6.

- Hayasaka S, Sears ML. Distribution of acid phosphatase, glucuronidase, and lysosomal hyaluronidase in the anterior chamber of the rabbit eye. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1978; 17:982-7.

- Hayreh SS. Pathogenesis of occlusion of the central retinal vessels. Am J Ophthalmol. 1971;72:998-1011.

- Hofmann HD, Möckel V. Release of gamma-amino[^{3}H]butyric acid from cultured amacrine-like neurons mediated by different excitatory amino acid receptors. J Neurochem. 1991; 56:923-32.

- Horio N, Horiguchi M. Central retinal vein occlusion with further reduction of retinal blood flow one year after radial optic neurotomy. Am J Ophthalmol. 2005;139:926-7.

- Hubbard WC, Johnson M, Gong H, Gabelt BT, Peterson JA, Sawhney R, Freddo T, Kaufman PL. Intraocular pressure and outflow facility are unchanged following acute and chronic intracameral chondroitinase ABC and hyaluronidase in monkeys. Exp Eye Res. 1997; 65:177-90

- Hubel DH. Eye, brain and vision. Scientific American Library, W.H. Freeman (ed.), serie # 22, New York 1988.

- Ignarro LJ, Bush PA, Buga GM, Rajfer J. Neurotransmitter identity doubt. Nature 1990;347:131-2.

- Ishikawa A, Shiono T, Ishiguro S, Tamai M. Postnatal developmental expression of glutamine and related amino acids in the rat retinas. Curr Eye Res. 1996:15:662-8.

- Iuvone PM, Rauch AL. Alpha 2-adrenergic receptors influence tyrosine hydroxylase activity in retinal dopamine neurons. Life Sci. 1983;33:2455-63.

- Iuvone PM, Avendano G, Butler BJ, Adler R. Cyclic AMP-dependent induction of serotonin N-acetyltransferase activity in photoreceptor-enriched chick retinal cell cultures: characterization and inhibition by dopamine. J Neurochem. 1990;55:673-82.

- Iuvone PM, Chong NW, Bernard M, Brown AD, Thomas KB, Klein DC. Melatonin biosynthesis in chicken retina. Regulation of tryptophan hydroxylase and arylalkylamine N-acetyltransferase. Adv Exp Med Biol. 1999;460:31-41.

- Ivanova TN, Iuvone PM. Melatonin synthesis in retina: circadian regulation of arylalkylamine N-acetyltransferase activity in cultured photoreceptor cells of embryonic chicken retina. Brain Res. 2003;973:56-63.

- Johansson JO. Inhibition of retrograde axoplasmic transport in rat optic nerve by increased IOP in vitro. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1983;24:1552-8.

- Johnson J, Chen TK, Rickman DW, Evans C, Brecha NC. Multiple gamma-Aminobutyric acid plasma membrane transporters (GAT-1, GAT-2, GAT-3) in the rat retina. J Comp Neurol. 1996;375:212-24.

- Johnson M. 'What controls aqueous humour outflow resistance? Exp Eye Res. 2006;82:545-57.

- Johnson MA, Drum BA, Quigley HA, Sanchez RM, Dunkelberger GR. Pattern-evoked potentials and optic nerve fiber loss in monocular laser-induced glaucoma. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1989;30:897-907.

- Johnson MA, Vardi N. Regional differences in GABA and GAD immunoreactivity in rabbit horizontal cells. Vis Neurosci. 1998;15:743-53.

- Jurgens I, Matheu A, Castilla M. Ocular hypertension after cataract surgery: a comparison of three surgical techniques and two viscoelastics. Ophthalmic Surg Lasers 1997; 28:30-6.

- Kalloniatis M, Tomisich G. Amino acid neurochemistry of the vertebrate retina. Prog Retin Eye Res. 1999;18:811-66.

- Kanai Y, Endou H. Heterodimeric amino acid transporters: molecular biology and pathological and pharmacological relevance. Current Drug Metabolism 2001;2:339-54.

- Kandel E. Principios de neurociencia, McGraw-Hill Interamericana de España, 2001.

- Kanski JJ. Clinical Ophthalmology, 4d edition, Elsevier Health Sciences. 2005.

- Kaysen GA, Strecker HJ. Purification and properties of arginase of rat kidney. Biochem J. 1973;133:779-88.

- Khatsenko O, Kikkawa Y. Nitric oxide differentially affects constitutive cytochrome P450 isoforms in rat liver. J Pharmacol Exp Ther. 1997;280:1463-70.

- Kiuchi Y, Mockovak ME, Gregory DS. Melatonin does not increase IOP significantly in rabbits. Curr Eye Res 1993;12:181-90.

- Klein BE, Klein R, Jensen SC. Open-angle glaucoma and older-onset diabetes. The Beaver Dam Eye Study. Ophthalmology 1994;101:1173-7.

- 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. The melatonin rhythm-generating enzyme: molecular regulation of serotonin N-acetyltransferase in the pineal gland. Recent Prog Horm Res. 1997;52:307-57.

- Knepper PA, Goossens W, Hvizd M, Palmberg PF. Glycosaminoglycans of the human trabecular meshwork in primary open-angle glaucoma. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1996; 37:1360-7.

- Kolker AE, Hetherington J Jr. Becker-Shaffer's Diagnosis and Therapy of the Glaucomas, 5th ed. St Louis, CV Mosby, 1981.

- Koshiyama Y, Gotoh T, Miyanaka K, Kobayashi T, Negi A, Mori M. Expression and localization of enzymes of arginine metabolism in the rat eye. Curr Eye Res. 2000;20:313-21.

- Koss MC. Functional role of nitric oxide in regulation of ocular blood flow. Eur J Pharmacol. 1999;374:161-74.

- Kowluru RA, Abbas SN. Diabetes-induced mitochondrial dysfunction in the retina. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2003;44:5327-34.

- Kurysheva NI, Vinetskaia MI, Erichev VP, Demchuk ML, Kuryshev SI. Contribution of free-radical reactions of chamber humor to the development of primary open-angle glaucoma. Vestn Oftalmol. 1996;112:3-5.

- Kurz S, Harrison D. Insulin and the arginine paradox. J Clin Invest. 1997;99:369-70.

- Kvamme E, Torgner IA, Svenneby G. Glutaminase from mammalian tissues. Methods Enzymol. 1985;113:241-56.

- Kwong JM, Lam TT, Caprioli J Hyperthermic pre-conditioning protects retinal neurons from N-methyl-D-aspartate (NMDA)-induced apoptosis in rat. Brain Res. 2003;970:119-30.

- Lassmann H, Pamperl H, Stockinger G. Morphological-functional aspects of intima pads in the rat ophthalmic artery. Z Mikrosk Anat Forsch 1972;85:139-48.

- León J, Vives F, Crespo E, Camacho E, Espinosa A, Gallo MA, Escames G, Acuña-Castroviejo D. Modification of nitric oxide synthase activity and neuronal response in rat striatum by melatonin and kynurenine derivatives. J Neuroendocrinol. 1998;10:297-302.

- León J, Acuña-Castroviejo D, Escames G, Tan DX, Reiter RJ. Melatonin mitigates mitochondrial malfunction. J Pineal Res. 2005;38:1-9.

- Lerner AB, Case JD, Mori W, Wright MR. Melatonin in peripheral nerve. Nature 1959;183:1821.

- Lerner LE, Polansky JR, Howes EL, Stern R. Hyaluronan in the human trabecular meshwork. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1997;38:1222-8.

- Levkovitch-Verbin H, Martin KR, Quigley HA, Baumrind LA, Pease ME, Valenta D. Measurement of amino acid levels in the vitreous humor of rats after chronic intraocular pressure elevation or optic nerve transection. J Glaucoma 2002;11:396-405.

- Li B, Yang C, Rosenbaum DM, Roth S. Signal transduction mechanisms involved in ischemic preconditioning in the rat retina in vivo. Exp Eye Res. 2000;70:755-65.

- Li P, Pang SF y Tsang CW. Retinal 5-methoxytryptamine and 5-methoxyindole-3-acetic acid in the rat and quail: diurnal rhythms and interspecies differences. Biochem Biophys Res Comm. 1997;239:353-6.

- Li Y, Schlamp CL, Nickells RW. Experimental induction of retinal ganglion cell death in adult mice. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1999;40:1004-8.

- Lima AC, Louzada PR, De Mello FG, Ferreira ST. Neuroprotection against Abeta and glutamate toxicity by melatonin: are GABA receptors involved? Neurotox Res. 2003;5:323-7.

- Liu B, Neufeld AH. Expression of nitric oxide synthase-2 (NOS-2) in reactive astrocytes of the human glaucomatous optic nerve head. Glia 2000;30:178-86.

- Liu JH, Dacus AC. Endogenous hormonal changes and circadian elevation of intraocular pressure. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1991;32:496-500.

- Liversidge J, Dick A, Gordon S. Nitric oxide mediates apoptosis through formation of peroxynitrite and Fas/Fas-ligand interactions in experimental autoimmune uveitis. Am J Pathol. 2002;160:905-16.

- Lopez-Costa JJ, Goldstein J, Pecci-Saavedra J. GABA release mechanism in the golden hamster retina. Int J Neurosci. 1999;98:13-25.

- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem. 1951;193:265-75.

- Lozano-Elizondo D. Prolífico genio en oftalmología: Albrecht Von Graefe (1828-1870). Rev Mex Oftalmol. 2010; 84:132-6.

- Macknight AD, McLaughlin CW, Peart D, Purves RD, Carre DA, Civan MM. Formation of the aqueous humor. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2000;27:100-6.

- Manabe S, Gu Z, Lipton SA. Activation of matrix metalloproteinase-9 via neuronal nitric oxide synthase contributes to NMDA-induced retinal ganglion cell death. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2005;46:4747-53.

- Martínez-Jardón CS, Meza-de Regil A, Dalma-Weiszhausz J, Leizaola-Fernández C, Morales-Cantón V, Guerrero-Naranjo JL, Quiroz-Mercado H. Radial optic neurotomy for ischaemic central vein occlusion. Br J Ophthalmol. 2005; 89:558-61.

- Martínez-Ruiz A, Lamas S. S-nitrosylation: a potential new paradigm in signal transduction. Cardiovasc Res. 2004;62:43-52.

- Martínez-Sánchez G, Giuliani A, Pérez-Davison G, León-Fernández OS. Oxidized proteins and their contribution to redox homeostasis. Redox Rep. 2005;10:175-85.

- Masland RH. The fundamental plan of the retina. Nat Neurosci. 2001a;4:877-86.

- Masland RH. Neuronal diversity in the retina. Curr Opin Neurobiol. 2001b;11:431-6.

- Massey SC, Redburn DA. Transmitter circuits in the vertebrate retina. Prog Neurobiol. 1987;28:55-96.

- May CA, Lütjen-Drecoll E. Morphology of the murine optic nerve. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2002;43:2206-12.

- McGoogan JM, Cassone VM. Circadian regulation of chick electroretinogram: effects of pinealectomy and exogenous melatonin. Am J Physiol. 1999;277:R1418-27.

- Mehta AK, Ticku MK. An update on GABAA receptors. Brain Res Brain Res Rev. 1999;29:196-217.

- Melino G, Bernassola F, Knight RA, Corasaniti MT, Nistico G, Finazzi-Agro A. S-nitrosylation regulates apoptosis. Nature 1997;388:432-3.

- Mermoud A, Baerveldt G, Minckler DS, Prata JA Jr, Rao NA. Aqueous humor dynamics in rats. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 1996; 234 Suppl 1: S198-203.

- Meyer-Bothling U, Bron AJ, Osborne NN. Topical application of serotonin or the 5-HT1-agonist 5-CT intraocu- lar pressure in rabbits. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1993;34:3035-42.

- Michel T, Li GK, Busconi L. Phosphorylation and subcellular translocation of endothelial nitric oxide synthase. Proc Natl Acad Sci. U.S.A. 1993;90:6252-6.

- Militante J, Lombardini JB. Age-related retinal degeneration in animal models of aging: possible involvement of taurine deficiency and oxidative stress. Neurochem Res. 2004;29:151-60.

- Minckler DS, Bunt AH, Johanson GW. Orthograde and retrograde axoplasmic transport during acute ocular hypertension in the monkey. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1977;16:426-41.

- Mitchell CK, Redburn DA. Melatonin inhibits ACh release from rabbit retina. Vis Neurosci. 1991;7:479-86.

- Mittag TW, Danias J, Pohorenec G, Yuan HM, Burakgazi E, Chalmers-Redman R, Podos SM, Tatton WG. Retinal damage after 3 to 4 months of elevated intraocular pressure in a rat glaucoma model. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2000;41:3451-9.

- Moore CG, Epley D, Milne ST, Morrison JC. Long-term non-invasive measurement of intraocular pressure in the rat eye. Curr Eye Res. 1995;14:711-7.

- Moreno MC, Campanelli J, Sande P, Sánez DA, Keller Sarmiento MI, Rosenstein RE. Retinal oxidative stress induced by high intraocular pressure. Free Radic Biol Med. 2004;37:803-12.

- Moreno MC, Marcos HJ, Oscar Croxatto J, Sande PH, Campanelli J, Jaliffa CO, Benozzi J, Rosenstein RE. A new experimental model of glaucoma in rats through intracameral injections of hyaluronic acid. Exp Eye Res. 2005a;81:71-80.

- Moreno MC, Sande P, Marcos HA, de Zavalía N, Keller Sarmiento MI, Rosenstein RE. Effect of glaucoma on the retinal glutamate/glutamine cycle activity. FASEB J. 2005b;19:1161-2.

- Moreno MC, de Zavalía N, Sande P, Jaliffa CO, Fernandez DC, Keller Sarmiento MI, Rosenstein RE. Effect of ocular hypertension on retinal GABAergic activity. Neurochem Int. 2008;52:675-82.

- Morera AL, Henry M, de La Varga M. Safety in melatonin use. Actas Esp Psiquiatr. 2001; 29:334-7.

- Morgan JE. Optic nerve head structure in glaucoma: astrocytes as mediators of axonal damage. Eye 2000;14:437-44.

- Morrison JC, Dorman-Pease ME, Dunkelberger GR, Quigley HA. Optic nerve head extracellular matrix in primary optic atrophy and experimental glaucoma. Arch Ophthalmol. 1990;108:1020-4.

- Morrison J, Farrell S, Johnson E, Deppmeier L, Moore CG, Grossmann E. Structure and composition of the rodent lamina cribrosa. Exp Eye Res. 1995;60:127-35.

- Morrison JC, Moore CG, Deppmeier LM, Gold BG, Meshul CK, Johnson EC. A rat model of chronic pressure-induced optic nerve damage. Exp Eye Res. 1997;64:85-96.

- Mosinger JL, Yazulla S, Studholme KM. GABA-like immunoreactivity in the vertebrate retina: a species comparison, Exp Eye Res. 1986;42:631-44.

- Muller A, Pietri S, Villain M, Frejaville C, Bonne C, Culcas M. Free radicals in rabbit retina under ocular hyperpressure and functional consequences. Exp Eye Res. 1997;64:637-43.

- Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. Circulation 1986;74:1124-36.

- Nao-i N, Nilsson SE, Gallemore RP, Steinberg RH. Effects of melatonin on the chick retinal pigment epithelium: membrane potentials and light-evoked responses. Exp Eye Res. 1989; 49:573-89.

- Nelson N. The Family of Na + / Cl Neurotransmitter Transporters. J Neurochem. 1998;71: 1785-803.

- Neufeld AH, Sawada A, Becker B. Inhibition of nitric-oxide synthase 2 by aminoguanidine provides neuroprotection of retinal ganglion cells in a rat model of chronic glaucoma. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999;96:9944-8.

- Neufeld AH, Kawai S, Das S, Vora S, Gachie E, Connor JR, Manning PT. Loss of retinal ganglion cells following retinal ischemia: the role of inducible nitric oxide synthase. Exp Eye Res. 2002;75:521-8.

- Nishida K, Ohta Y, Kongo M, Ishiguro I. Response of endogenous reduced glutathione through hepatic glutathione redox cycle to enhancement of hepatic lipid peroxidation with the development of acute liver injury in mice intoxicated with carbon tetrachloride. Res Commun Mol Pathol Pharmacol. 1996;93:198-218.

- Nordlund JJ, Lerner AB. The effects of oral melatonin on skin color and on the release of pituitary hormones. J Clin Endocrinol Metab. 1977;45:768-74.

- Nowak JZ, Wawrocka M. Intravitreal application of membrane-permeable analogs of cyclic GMP increases serotonin N-acetyltransferase (NAT) activity in retinas of light-exposed chicks: comparison with the effect of cyclic AMP analogs and darkness. Neurosci Lett. 1993;162:21-4.

- Ohia SE, Opere CA, Leday AM. Pharmacological consequences of oxidative stress in ocular tissues. Mutat Res. 2005; 579:22-36.

- Ohtake K, Matsumoto M, Wakamatsu H, Kawai K, Nakakimura K, Sakabe T. Glutamate release and neuronal injury after intrathecal injection of local anesthetics. Neuroreport 2000; 11:1105-9.

- Opremcak EM, Bruce RA, Lomeo MD, Ridenour CD, Letson AD, Rehmar AJ. Radial optic neurotomy for central retinal vein occlusion: a retrospective pilot study of 11 consecutive cases. Retina 2001;21:408-415.

- Opremcak EM, Rehmar AJ, Ridenour CD, Kurz DE. Radial optic neurotomy for central retinal vein occlusion: 117 consecutive cases. Retina 2006a; 26:297-305.

- Opremcak EM, Rehmar AJ, Ridenour CD, Kurz DE, Borkowski LM.. Radial optic neurotomy with adjunctive intraocular triamcinolone for central retinal vein occlusion: 63 consecutive cases. Retina 2006b;26:306-13

- Osborne NN, Ugarte M, Chao M, Chidlow G, Bae JH, Wood JP, Nash MS. Neuroprotection in relation to retinal ischemia and relevance to glaucoma. Surv Ophthalmol. 1999;43 Suppl 1:S102-28.

- Ostwald P, Goldstein IM, Pachnanda A, Roth S. Effect of nitric oxide synthase inhibition on blood flow after retinal ischemia in cats. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1995;36:2396-403.

- Ozbay D, Ozden S, Müftüoğlu S, Kaymaz F, Yaylali V, Yildirim C, Tatlipinar S. Protective effect of ischemic preconditioning on retinal ischemia-reperfusion injury in rats. Can J Ophthalmol. 2004; 39:727-32.

- Pang IH. Protection by eliprodil against excitotoxicity in cultured rat retinal ganglion cells. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1999;40:1170-6.

- Pang IH, Johnson EC, Jia L, Cepurna WO, Shepard AR, Hellberg MR, Clark AF, Morrison JC. Evaluation of inducible nitric oxide synthase in glaucomatous optic neuropathy and pressure-induced optic nerve damage. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2005;46:1313-21.

- Pang SF, Brown GM, Grota LJ, Chambers JW, Rodman RL. Determination of N-acetylserotonin and melatonin activities in the pineal gland, retina, harderian gland, brain and serum of rats and chickens. Neuroendocrinology 1977;23:1-13.

- Pang SF, Dubocovich ML, Brown GM. Melatonin receptors in peripheral tissues: a new area of melatonin research. Biol Signals 1993;2:177-80.

- Papp A, Németh I, Karg E, Papp E. Glutathione status in retinopathy of prematurity. Free Radic Biol Med. 1999;27:738-43.

- Papst N, Bopp M, Schnaudigel OE. Pattern electroretinogram and visually evoked cortical potentials in glaucoma. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 1984;222:29-33.

- Park SH, Kim JH, Kim YH, Park CK. Expression of neuronal nitric oxide synthase in the retina of a rat model of chronic glaucoma. Vision Res. 2007;47:2732-40.

- Pasupathy S, Homer-Vanniasinkam S. Ischaemic preconditioning protects against ischaemia/reperfusion injury: emerging concepts. Eur J Vasc Endovasc Surg 2005;29:106-15.

- Pierce ME, Besharse JC. Melatonin and rhythmic photoreceptor metabolism: melatonin-induced cone elongation is blocked at high light intensity. Brain Res. 1987;405:400-4.

- Pierce ME, Besharse JC. Circadian regulation of retinomotor movements: II. The role of GABA in the regulation of cone position. J Comp Neurol. 1988;270:279-87.

- Pintor J, Martin L, Pelaez T, Hoyle CH, Peral A. Involvement of melatonin MT(3) receptors in the regulation of intraocular pressure in rabbits. Eur J Pharmacol 2001;416:251-54.

- Poeggeler B, Reiter RJ, Tan DX, Chen LD, Manchester LC. Melatonin: a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. Endocr J. 1993;1:57-60.

- Poitry S, Poitry-Yamate C, Ueberfeld J, MacLeish PR, Tsacopoulos M. Mechanisms of glutamate metabolic signaling in retinal glial (Muller) cells. J Neurosci. 2000;20:1809-21.

- Pourcho RG, Goebel DJ. Neuronal subpopulations in cat retina which accumulate the GABA agonist, (^{3}H)muscimol: a combined Golgi and autoradiographic study. J Comp Neurol. 1983; 219:25-35.

- Pow DV. Amino acids and their transporters in the retina. Neurochem Int. 2001;38:463-84.

- Pozo D, Reiter RJ, Calvo JC, Guerrero JM. Inhibition of cerebellar nitric oxide synhtase and cyclic GMP production by melatonin via complex formation with calmodulin. J Cell Biochem. 1997;65:430-42.

- Quay WB. Indole derivatives of pineal and related neural and retinal tissues. Pharmacol Rev. 1965;17:321-45.

- Quigley HA. Neuronal death in glaucoma. Prog Retin Eye Res. 1999;18:39-57.

- Quigley H, Anderson DR. The dynamics and location of axonal transport blockade by acute intraocular pressure elevation in primate optic nerve. Invest Ophthalmol. 1976;15:606-16.
- Quigley HA, Anderson DR. Distribution of axonal transport blockade by acute intraocular pressure elevation in the primate optic nerve head. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1977;16:640-4.

- Quigley HA, Enger C, Katz J, Sommer A, Scott R, Gilbert D. Risk factors for the development of glaucomatous visual field loss in ocular hypertension. Arch Ophthalmol. 1994; 112:644-9.

- Rada JA, Wiechmann AF. Melatonin receptors in chick ocular tissues: implications for a role of melatonin in ocular growth regulation. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2006;47:25-33.

- Rauen T. Diversity of glutamate transporter expression and function in the mammalian retina, Amino Acids 2000;19:53-62.

- Rauen T, Wiessner M. Fine tuning of glutamate uptake and degradation in glial cells: common transcriptional regulation of GLAST1 and GS. Neurochem Int. 2000;37:179-89.

- Rauen T, Taylor WR, Kuhlbrodt K, Wiessner M. High-affinity glutamate transporters in the rat retina: a major role of the glial glutamate transporter GLAST-1 in transmitter clearance. Cell Tissue Res. 1998;291:19-31.

- Raviola G. Effects of paracentesis on the blood-aqueous barrier: An electron microscope study on Macaca mullata using horseradish peroxidase as a tracer. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1974;13:828.

- Raviola G. The structural basis of the blood-ocular barriers. Exp Eye Res. 1977; 25 Suppl:27-63.

- Reiter RJ. The role of the neurohormone melatonin as a buffer against macromolecular oxidative damage. Neurochem Int. 1995;27:453-60.

- Reiter RJ, Carneiro RC, Oh CS. Melatonin in relation to cellular antioxidative defense mechanisms. Horm Metab Res. 1997;29:363-72.

- Reiter RJ, Paredes SD, Manchester LC, Tan DX. Reducing oxidative/nitrosative stress: a newly-discovered genre for melatonin. Crit Rev Biochem Mol Biol. 2009; 44:175-200.

- Ren C, Gao X, Steinberg GK, Zhao H. Limb remote-preconditioning protects against focal ischemia in rats and contradicts the dogma of therapeutic time windows for preconditioning. Neuroscience 2008;151:1099-103.

- Richler M, Werner EB, Thomas D. Risk factors for progression of visual field defects in medically treated patients with glaucoma. Can J Ophthalmol. 1982;17:245-8.

- Roberts MD, Sigal IA, Liang Y, Burgoyne CF, Downs JC. Changes in the biomechanical response of the optic nerve head in early experimental glaucoma. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2010;51:5675-84.

- Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolín I, Herrera F, Martín V, Reiter RJ. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. J Pineal Res. 2004;36:1-9.

- Rohen JW. Why is intraocular pressure elevated in chronic simple glaucoma? Anatomical considerations. Ophthalmology 1983;90:758-65.

- Rohen JW, van der Zypen E. The phagocytic activity of the trabecularmeshwork endothelium. An electron-microscopic study of the vervet (Cercopithecus aethiops). Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol. 1968;175:143-60.

- Rosenstein RE, Cardinali DP. Melatonin increases in vivo GABA accumulation in rat hypothalamus, cerebellum, cerebral cortex and pineal gland. Brain Res. 1986; 98:403-406.

- Rosenstein RE, Estévez AG, Cardinali DP. Time-dependent effect of melatonin on glutamic acid decarboxylase activity and Cl influx in rat hypothalamus. J Neuroendocrinol. 1989;1:443-7.

- Rosenstein RE, Dubocovich ML. 2-[^{125}I]-Iodomelatonin binding sites in the golden hamster retina by autoradiography. Biol Rhythm Res. 2001;32:191-200

- Rossi DJ, Hamann M, Attwell D. Multiple modes of GABAergic inhibition of rat cerebellar granule cells. J Physiol. 2003;548:97-110.

- Roth S, Li B, Rosenbaum PS, Gupta H, Goldstein IM, Maxwell KM, Gidday JM. Preconditioning provides complete protection against retinal ischemic injury in rats. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1998; 39:777-85.

- Roth S. Endogenous neuroprotection in the retina. Brain Res Bull. 2004;62:461-6.

- Rothstein JD, Tsai G, Kuncl RW, Clawson L, Cornblath DR, Drachman DB, Pestronk A, Stauch BL, Coyle JT.Abnormal excitatory amino acid metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. Ann Neurol. 1990;28:18-25.

- Sáenz DA, Turjanski AG, Sacca GB, Marti M, Doctorovich F, Sarmiento MI, Estrin DA, Rosenstein RE. Physiological concentrations of melatonin inhibit the nitridergic pathway in the Syrian hamster retina. J Pineal Res 2002;33:31-6

- Sáenz DA, Goldin AP, Minces L, Chianelli M, Sarmiento MI, Rosenstein RE. Effect of melatonin on the retinal glutamate/glutamine cycle in the golden hamster retina. FASEB J. 2004; 18:1912-3.

- Sakamoto K, Kuwagata M, Nakahara T, Ishii K. Late preconditioning in rat retina: involvement of adenosine and ATP-sensitive K(+)channel. Eur J Pharmacol. 2001;418:89-93.

- Sampaolesi R. Glaucoma, Editorial médica Panamericana. 2. ª edición. Buenos Aires 1991.

- Samples JR, Krause G, Lewy AJ. Effect of melatonin on intraocular pressure. Curr Eye Res. 1988;7:649-53.

- Samuel M, Desai U, Gandolfo C. Peripapillary retinal detachment after radial optic neurotomy for central retinal vein occlusion. Retina 2003;23:580-3.

- Sasisekharan R, Raman R, Prabhakar V. Glycomics approach to structure-function relationships of glycosaminoglycans. Annu Rev Biomed Eng. 2006;8:181-231.

- Sattler R, Xiong Z, Lu WY, Hafner M, MacDonald JF, Tymianski M. Specific coupling of NMDA receptor activation to nitric oxide neurotoxicity by PSD-95 protein. Science 1999; 284:1845-8.

- Savaskan E, Wirz-Justice A, Olivieri G, Pache M, Krauchi K, Brydon L, Jockers R, Muller-Spahn F, Meyer P. Distribution of melatonin MT1 receptor immunoreactivity in human retina. J Histochem Cytochem. 2002;50:519-26.

- Sawaguchi S, Yue BY, Yeh P, Tso MO. Effects of intracameral injection of chondroitinase ABC in vivo. Arch Ophthalmol. 1992;110:110-7.

- Saxena P, Newman MA, Shehatha JS, Redington AN, Konstantinov IE. Remote ischemic conditioning: evolution of the concept, mechanisms, and clinical application. J Card Surg. 2010; 25:127-34.

- Scher J, Wankiewicz E, Brown GM, Fujieda H. MT(1) melatonin receptor in the human retina: expression and localization. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2002;43:889-97.

- Scher J, Wankiewicz E, Brown GM, Fujieda H. AII amacrine cells express the MT1 melatonin receptor in human and macaque retina. Exp Eye Res. 2003;77:375-82.

- Schneider U, Inhoffen W, Grisanti S, Bartz-Schmidt KU. Characteristics of visual field defects by scanning laser ophthalmoscope microperimetry after radial optic neurotomy for central retinal vein occlusion. Retina 2005;25:704-12.

- Schwartz EA. Depolarization without calcium can release gamma-aminobutyric acid from a retinal neuron. Science 1987;238:350-5.

- Schwartz EA. Transport-mediated synapses in the retina. Physiol Rev. 2002;82:875-91.

- Seabra ML, Bignotto M, Pinto LR Jr, Tufik S. Randomized, double-blind clinical trial, controlled with placebo, of the toxicology of chronic melatonin treatment. J Pineal Res. 2000; 29:193-200.

- Sears ML. Regulation of aqueous flow by the adenylate cyclase receptor complex in the ciliary epithelium. Am J Ophthalmol. 1985;100:194-8.

- Selimoglu O, Ugurlucan M, Basaran M, Gungor F, Banach M, Cucu O, Ong LL, Gasparyan AY, Mikhailidis D, Ogus TN. Efficacy of remote ischaemic preconditioning for

spinal cord protection against ischaemic injury: association with heat shock protein expression. Folia Neuropathol. 2008;46:204-12.

- Serle JB, Wang RF, Peterson WM, Plourde R, Yerxa BR.. Effect of 5-MCA- NAT, a putative melatonin MT3 receptor agonist, on intra- ocular pressure in glaucomatous monkey eyes. J Glaucoma. 2004;13:385-8.

- Sessa WC. The nitric oxide synthase family of proteins. J Vasc Res. 1994;31:131-43.

- Sewerynek E, Abe M, Reiter RJ, Barlow-Walden LR, Chen L, McCabe TJ, Roman LJ, Díaz-Lopez B. Melatonin administration prevents lipopolysaccharide-induced oxidative damage in phenobarbital-treated animals. J Cell Biochem. 1995;58:436-44.

- Shaked I, Ben-Dror I y Vardimon L. Glutamine synthetase enhances the clearence of extracellular glutamate by the neural retina. J Neurochem. 2002;83:574-80.

- Shareef SR, Garcia-Valenzuela E, Salierno A, Walsh J, Sharma SC. Chronic ocular hypertension following episcleral venous occlusion in rats. Exp Eye Res. 1995;61:379-82.

- Shin DH, Beker B, Kolker AE. Family history in primary open angle glaucoma. Arch Ophtalmol. 1977;95:598.

- Silbert JE, Sugumaran G. Biosynthesis of chondroitin/dermatan sulfate. IUBMB Life. 2002;54:177-86.

- Siu AW, Reiter RJ, To CH. Pineal indoleamines and vitamin E reduce nitric oxide-induced lipid peroxidation in rat retinal homogenates. J Pineal Res. 1999;27:122-8.

- Siu AW, Maldonado M, Sanchez-Hidalgo M, Tan DX, Reiter RJ. Protective effects of melatonin in experimental free radical-related ocular diseases. J Pineal Res 2006;40:101-9.

- Smith RS, Rudt LA. Ultrastructural studies of the blood-aqueous barrier: II. The barrier to horseradish peroxidase in primates. Am J Ophthalmol. 1973;76:937.

- Stamler JS, Meissner G. Physiology of nitric oxide in skeletal muscle. Physiol Rev. 2001; 81:209-37.

- Stamper R. Aqueous humor: Secretion and dynamics. In Tasman W, Jaeger E (eds): Duane's Foundations of Clinical Ophthalmology, Vol 2, Philadelphia, JB Lippincott ,1992.

- Stevens BR, Kakuda DK, Yu K, Waters M., Vo CB, Raizada MK. Induced nitric oxide synthesis is dependent on induced alternatively spliced CAT-2 encoding L-arginine transport in brain astrocytes. J Biol Chem. 1996;271:24017-22.

- Stuehr DJ. Mammalian nitric oxide synthases. Biochim Biophys Acta. 1999;1411:217-30.

- Sucher NJ, Lipton SA, Dreyer EB. Molecular basis of glutamate toxicity in retinal ganglion cells. Vision Res. 1997;37:3483-93.

- Sugahara K, Kitagawa H. Heparin and heparan sulfate biosynthesis. IUBMB Life. 2002;54:163-75.

- Sumioka K, Shirai Y, Sakai N, Hashimoto T, Tanaka C, Yamamoto M, Takahashi M, Ono Y, Saito N. Induction of a 55-kDa PKN cleavage product by ischemia/reperfusion model in the rat retina. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2000;41:29-35.

- Szatkowski M, Barbour B, Attwell D. Non-vesicular release of glutamate from glial cells by reversed electrogenic glutamate uptake. Nature 1990;348:443-446.

- Takahata K, Katsuki H, Kume T, Nakata D, Ito K, Muraoka S, Yoneda F, Kashii S, Honda Y, Akaike A. Retinal neuronal death induced by intraocular administration of a nitric oxide donor and its rescue by neurotrophic factors in rats. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2003;44:1760-6.

- Tamm ER, Carassa RG, Albert DM, Gabelt BT, Patel S, Rasmussen CA, Kaufman PL. Viscocanalostomy in rhesus monkeys. Arch Ophthalmol. 2004;122:1826-38.

- Tanaka K. Functions of glutamate transporters in the brain. Neurosci Res. 2000;37:15-9.

- Tapuria N, Kumar Y, Habib MM, Abu Amara M, Seifalian AM, Davidson BR. Remote ischemic preconditioning: a novel protective method from ischemia reperfusion injury--a review. J Surg Res. 2008;150:304-30.

- Textorius O, Nilsson SE. 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. 1987;65:97-111.

- Tezel G. Oxidative stress in glaucomatous neurodegeneration: Mechanisms and consequences. Prog Retin Eye Res. 2006;25:490-513.

- Tezel G, Yang X. Caspase-independent component of retinal ganglion cell death, in vitro. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2004;45:4049-59.

- The Central Vein Occlusion Study Group. Natural history and clinical management of central retinal vein occlusion. Arch Ophthalmol. 1997;115:486-491.

- Tielsch JM, Katz J, Sommer A, Quigley HA, Javitt JC. Family history and risk of primary open angle glaucoma. The Baltimore Eye Survey. Arch Ophthalmol. 1994;112:69-73.

- Tilton RG, Chang K, Hasan KS, Smith SR, Petrash JM, Misko TP, Moore WM, Crrrrie MG, Corbett JA, McDaniel ML, Williamson JR. Prevention of diabetic vascular dysfunctionby guanidines:Inhibitionof nitric oxidesynthaseversus advancedglycation end-productformation. Diabetes 1993;42:221-32.

- Toriu N, Akaike A, Yasuyoshi H, Zhang S, Kashii S, Honda Y, Shimazawa M, Hara H. Lomerizine, a Ca2+ channel blocker, reduces glutamate-induced neurotoxicity and ischemia/reperfusion damage in rat retina. Exp Eye Res. 2000;70:475-84.

- Tosini G. Melatonin circadian rhythm in the retina of mammals. Chronobiol Int. 2000;17:599-612.

- Tosini G, Menaker M. Circadian rhythm in cultured mammalian retina. Science 1996;272: 419-421.

- Towle VL, Moskowitz A, Sokol S, Schwartz B. The visual evoked potential in glaucoma and ocular hypertension: effects of check size, field size, and stimulation rate. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1983;24:175-83.

- Turjanski AG, Rosenstein RE, Estrin DA. Reactions of melatonin and related indoles with free radicals: a computational study. J Med Chem. 1998;41:3684-9.

- Turjanski A, Chaia ZD, Doctorovich F, Estrin D, Rosenstein R, Piro OE. N-nitrosomelatonin. Acta Crystallogr C. 2000;56:682-3.
- Ueda J, Sawaguchi S, Hanyu T, Yaoeda K, Fukuchi T, Abe H, Ozawa H. Experimental glaucoma model in the rat induced by laser trabecular photocoagulation after an intracameral injection of India ink. Jpn J Ophthalmol. 1998;42:337-44.

- Uusi-Oukari M, Kosonen P, Homanics GE, Korpi ER. Brain regional heterogeneity of pH effects on GABA(A) receptor-associated [^{35}S]TBPS binding. Neurochem Res. 2004;29:771-80.

- Väänänen AJ, Moed M, Tuominen RK, Helkamaa TH, Wiksten M, Liesi P, Chiueh CC, Rauhala P. Angeli's salt induces neurotoxicity in dopaminergic neurons in vivo and in vitro. Free Radic Res. 2003;37:381-9.

- Valenciano AI, Alonso-Gómez AL, Iuvone PM. Regulation of tryptophan hydroxylase activity in Xenopus laevis photoreceptor cells by cyclic AMP. J Neurochem. 2000;74:1961-7.

- Van Buskirk EM, Brett J. The canine eye: in vitro dissolution of the barriers to aqueous outflow. Invest Ophthalmol Vis Sci.1978;17:258-71.

- Van Buskirk EM, Cioffi GA. Glaucomatous optic neuropathy. Am J Ophthalmol. 1992;113:447-52.

- Van Der Heyden JA, Korf J. Regional levels of GABA in the brain: rapid semiautomated assay and prevention of postmortem increase by 3-mercapto-propionic acid. J Neurochem. 1978; 31:197-203.

- Vaughn JE, Famiglietti EV Jr, Barber RP, Saito K, Roberts E, Ribak CE. GABAergic amacrine cells in rat retina: immunocytochemical identification and synaptic connectivity. J Comp Neurol. 1981;197:113-27.

- Vegge T, Ringvold A. The ultrastructure of the extracellular components of the trabecular meshwork in the human eye. Z Zellforsch Mikrosk Anat. 1971;115:361-76.

- Viswanathan S, Frishman LJ, Robson JG. The uniform field and pattern ERG in macaques with experimental glaucoma: removal of spiking activity. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2000; 41:2797-810.

- Vivar C, Gutierrez R. Blockade of the membranal GABA transporter potentiates GABAergic responses evoked in pyramidal cells by mossy fiber activation after seizures. Hippocampus 2005;15:281-4.

- Vivien-Roels B, Pevet P, Dubois M., Arendt J, Brown G. Immunohistochemical evidence for the presence of melatonin in the pineal gland, the retina and the Harderian gland. Cell Tiss Res. 1981;217:105-15.

- Vogel A, Holz FG, Loeffler KU. Histopathologic findings after radial optic neurotomy in central retinal vein occlusion. Am J Ophthalmol. 2006;141:203-5.

- von Michel J. Die spontane Thrombose der Vena centalis des Opticus. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 1878;24:37-44
- Vorwerk CK, Hyman BT, Miller JW, Husain D, Zurakowski D, Huang PL, Fishman MC, Dreyer EB. The role of neuronal and endothelial nitric oxide synthase in retinal excitotoxicity. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1997;38:2038-44.

- Vorwerk CK, Gorla MS, Dreyer EB. An experimental basis for implicating excitotoxicity in glaucomatous optic neuropathy. Surv Ophthalmol. 1999;43 Suppl 1:S142-50.

- Wang X, Ng YK, Tay SS. Factors contributing to neuronal degeneration in retinas of experimental glaucomatous rats. J Neurosci Res. 2005;82:674-89.

- Weber AJ, Zelenak D. Experimental glaucoma in the primate induced by latex microspheres. J Neurosci Methods 2001;111:39-48.

- Weinberg JB, Misukonis MA, Shami PJ, Mason SN, Sauls DL, Dittman WA, Wood ER, Smith GK, McDonald B, Bachus KE. Human mononuclear phagocyte inducible nitric oxide synthase (iNOS): analysis of iNOS mRNA, iNOS protein, biopterin, and nitric oxide production by blood monocytes and peritoneal macrophages. Blood 1995;86:1184-95.

- Wiechmann AF. Differential distribution of Mel1a and Mel1c melatonin receptorsin Xenopus laevis retina. Exp Eye Research. 2003;76:99-106.

- Wiechmann AF, Smith AR. Melatonin receptor RNA is expressed in photoreceptors and displays a diurnal rhythm in Xenopus retina. Brain Res Mol Brain Res. 2001;91:104-11.

- Williamson TH, Poon W, Whitefield L, Strothidis N, Jaycock P. A pilot study of pars plana vitrectomy, intraocular gas, and radial neurotomy in ischaemic central retinal vein occlusion. Br J Ophthalmol. 2003;87:1126-9.

- Wong PS, Hyun J, Fukuto JM, Shirota FN, DeMaster EG, Shoeman DW, Nagasawa HT. Reaction between S-nitrosothiols and thiols: generation of nitroxyl (HNO) and subsequent chemistry. Biochemistry 1998;37:5362-71.

- Wulle I, Schnitzer J. Distribution and morphology of tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons in the developing mouse retina. Brain Res Dev Brian Res. 1989;48:59-72.

- Yamamoto S, Takatsuna Y, Sato E, Mizunoya S. Central retinal artery occlusion after radial optic neurotomy in a patient with central retinal vein occlusion. Am J Ophthalmol. 2005;139:206-207.

- Yamamoto T, Kitazawa Y. Vascular pathogenesis of normal-tension glaucoma: a possible pathogenetic factor, other than intraocular pressure, of glaucomatous optic neuropathy. Prog Retin Eye Res. 1998;17:127-43.

- Yang XL. Characterization of receptors for glutamate and GABA in retinal neurons. Prog Neurobiol. 2004;73:127-50.

- Yellon DM, Hausenloy DJ. Realizing the clinical potential of ischemic preconditioning and postconditioning. Nat Clin Pract Cardiovasc Med. 2005; 2:568-75.

- Yu HS, Yee RW, Howes KA, Reiter RJ. Diurnal rhythms of immunoreactive melatonin in the aqueous humor and serum of male pigmented rabbits. Neurosci Lett. 1990; 116:309-14.

- Yu SY, Chiu JH, Yang SD, Yu HY, Hsieh CC, Chen PJ, Lui WY, Wu CW. Preconditioned hyperbaric oxygenation protects the liver against ischemia-reperfusion injury in rats. J Surg Res. 2005;128:28-36.

- Yusifov EY, Kerimova AA, Atalay M, Kerimov TM. Light exposure induces antioxidant enzyme activities in eye tissues of frogs. Pathophysiology 2000;7:203-7.

- Zawilska JB, Nowak JZ. Regulatory mechanisms in melatonin biosynthesis in retina. Neurochem Int. 1992;20:23-36.

- Zhang J, Wang HH, Yang CY. Synaptic organization of GABAergic amacrine cells in the salamander retina. Vis Neurosci. 2004;21:817-25.

- Zhu MD, Cai FY. Development of experimental chronic intraocu- lar hypertension in the rabbit. AustNZ. J Ophthalmol. 1992;20:225-34.