

Estudio del efecto terapéutico de la melatonina en un modelo de glaucoma experimental en ratas: conferencia de la Asociación de Investigación en Visión y Oftalmología 2008

MARÍA CECILIA MORENO, RUTH E. ROSENSTEIN

RESUMEN

El glaucoma primario de ángulo abierto es una de las principales causas de ceguera irreversible. El aumento de presión es el principal factor de riesgo del daño neuronal retinal y atrofia del nervio óptico. Sin embargo, otros factores también intervendrían colaborando con el daño neuronal. Los modelos experimentales de glaucoma son controvertidos y no responden claramente a la enfermedad en humanos. Basados en evidencias de que la región externa de la malla trabecular es el sitio de mayor resistencia a la salida de humor acuoso, que el aumento de la matriz extracelular constituida por glucosaminoglicanos es un hallazgo constante en esta enfermedad, y que algunos hipotensores tienen como mecanismo la activación de hialuronidasa para facilitar el drenaje de humor acuoso, desarrollamos un modelo experimental en ratas mediante la inyección de ácido hialurónico en cámara anterior logrando un aumento persistente de la PIO. En este modelo hemos podido determinar algunos mecanismos bioquímicos que explicarían el efecto deletéreo del aumento de PIO sobre las células neuronales y como contraparte, el efecto protector de la melatonina disminuyendo la pérdida de células ganglionares.

Experimental model of glaucoma in rats

ABSTRACT

Primary open angle glaucoma is one of the most frequent causes of irreversible blindness in the world. High intraocular pressure is the main risk factor for neuronal damage of the retina and the optic nerve. However, other factors may play an important role in the damage and protection of neuronal cells. Although experimental models of glaucoma have been developed, these models have been unable to represent the complexity of glaucoma in humans. Based on the fact that resistance to aqueous humor flow occurs in the outer region of the trabecular meshwork, that deposits of extracellular matrix composed mainly by glycosaminoglycans (GAGs) have demonstrated to play a role in increased resistance, and stimulation of enzymatic pathways of GAGs by medicated eye drops, we developed a model of glaucoma in rats by injection of hyaluronic acid in the anterior chamber with sustained high intraocular pressure. This rat model facilitated the identification of some biochemical retinal pathways that may contribute to either damage or protection of neuronal cells. In addition, we observed that melatonin may protect neuronal cells from oxidative damage reducing cell death.

Desarrollo de un modelo experimental de glaucoma en ratas

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 pérdida de células ganglionares retinales y la atrofia de la cabeza del nervio óptico. A pesar de la gran variedad de fármacos disponibles (agonistas o antagonistas adrenérgicos, agonistas colinérgicos, prostaglandinas sintéticas o inhibidores de la colinesterasa, entre otros) aún existe controversia en la terapia médica del glaucoma. Múltiples

pruebas experimentales demuestran que el aumento de la presión intraocular (PIO) desempeña un rol causal, aunque no exclusivo, en la pérdida visual glaucomatosa. De hecho, si bien la disminución farmacológica de la PIO es por ahora la terapia de elección, en muchos casos se ha observado que la pérdida visual persiste aún luego de su restauración a valores normales. Se ha sugerido que algunos factores adicionales como la excitotoxicidad inducida por glutamato¹, la privación de factores de crecimiento², el aumento en la producción de óxido nítrico (NO)³ o el daño oxidativo^{1,4}, podrían contribuir significativamente al progreso de la patología.

Laboratorio de Neuroquímica
Retinal y Oftalmología
Experimental, Departamento
de Bioquímica Humana,
Facultad de Medicina,
CEFyBO, UBA/CONICET
Paraguay 2155, 5to. piso
Buenos Aires, Argentina.
ruthr@fmed.med.ar

Desde hace varias décadas, la comunidad científica internacional ha reconocido 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 del humano, contribuye significativamente a la comprensión de un proceso en su contraparte humana. A pesar de múltiples intentos, el desarrollo de modelos experimentales para el estudio del glaucoma todavía no ha alcanzado suficiente consenso en un modelo que reproduzca completamente la enfermedad en animales de laboratorio, lo que ha constituido una limitación de consideración para la investigación en el área. En este contexto, uno de los objetivos de este trabajo fue desarrollar un nuevo modelo de glaucoma experimental en ratas.

El conjunto de evidencias anatómo-fisiológicas indica que el sitio primario de resistencia al flujo de humor acuoso reside en la malla trabecular, la porción profunda de la malla corneoescleral y la membrana basal juxtacanalicular cercana al canal de Schlemm. En este sentido, las evidencias indican que la matriz extracelular del trabeculado, constituida esencialmente por glicosaminoglicanos (GAGs), contribuye significativamente como barrera de filtración al pasaje de humor acuoso. El contenido de mucopolisacáridos trabeculares aumenta significativamente en el glaucoma cortisónico experimental⁵. El ácido hialurónico (AH) es el GAG más abundante en el trabeculado humano⁶ y se ha demostrado que la hialuronidasa exógena disminuye significativamente la resistencia al flujo acuoso⁷. En un trabajo previo hemos demostrado que un hipotensor ocular de uso frecuente, la brimonidina, aumenta significativamente la actividad de hialuronidasa trabecular en el conejo⁸. partir de estos resultados hemos postulado que el efecto hipotensor de la brimonidina podría estar mediado, al menos en parte, por la estimulación de esta actividad enzimática, es decir, por el aumento en el *clearance* de GAGs. Si una disminución en el contenido de GAGs

disminuye la presión intraocular (PIO), parece posible que el aumento en el contenido de AH trabecular induzca el efecto opuesto. Sobre la base de esta hipótesis hemos desarrollado un modelo de hipertensión ocular en ratas a través de la administración intracameral de AH. Una inyección única de AH mantiene la PIO elevada durante 8 días (fig. 1), mientras que su administración semanal induce una hipertensión sostenida que se mantiene a lo largo de todo el tratamiento realizado, que se extendió hasta 10 semanas (fig. 1). Varios autores han desarrollado modelos experimentales de hipertensión ocular en rata, generalmente impidiendo la salida de humor acuoso⁹⁻¹¹. Comparativamente con otros, el modelo desarrollado en nuestro laboratorio ofrece múltiples ventajas: 1) es económico y fácil de realizar, 2) permite obtener una hipertensión altamente consistente, 3) puede tener un curso razonablemente largo como para modelar una patología crónica, 4) las variaciones diarias de la PIO persisten en los ojos inyectados con AH y 5) en contraste con otros modelos, la inyección de AH no afecta en forma directa el flujo sanguíneo ocular¹². Además, este modelo puede ser utilizado para estudios farmacológicos dado que la administración aguda y local de fármacos hipotensores clásicos (brimonidina, latanoprost y timolol) revierten la hipertensión inducida por AH¹². Asimismo, hemos demostrado que a partir de 6 semanas de hipertensión ocular inducida por la administración de AH se observa una caída significativa en la amplitud de las ondas a y b del electroretinograma (ERG) escotópico (fig. 2), una disminución significativa en el número de células ganglionares y una disminución en el número de fibras del nervio óptico luego de 10 semanas de hipertensión ocular (fig. 3)¹³. En suma, estos resultados sugieren que el modelo de hipertensión ocular inducida por AH podría constituir una poderosa herramienta para identificar los mecanismos celulares a través de los cuales el aumento sostenido de la PIO provoca la muerte de las células ganglionares y la alteración progresiva de la cabeza del nervio óptico.

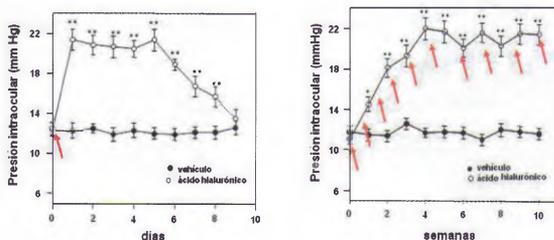


Figura 1. *Izquierda:* Efecto de una inyección única de AH sobre la PIO en ratas. La PIO se determinó mediante un Tono-Pen XL. La inyección de AH o vehículo se realizó el día 0 y la PIO se determinó diariamente hasta el día 9. *Derecha:* Efecto de la administración crónica de AH sobre la PIO en ratas. Las inyecciones de AH o solución salina se realizaron una vez/semana luego de la determinación de la PIO. El AH aumentó significativamente (a casi el doble) la PIO en ambos casos. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

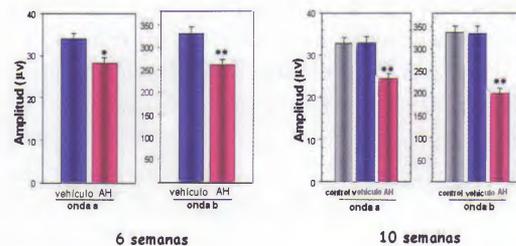


Figura 2. Amplitud de las ondas a y b del ERG escotópico de animales intactos o inyectados con vehículo o AH durante 6 o 10 semanas. Ambos parámetros disminuyeron significativamente en los animales inyectados con AH en ambos periodos. No se observaron diferencias entre animales intactos e inyectados con vehículo durante 10 semanas. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

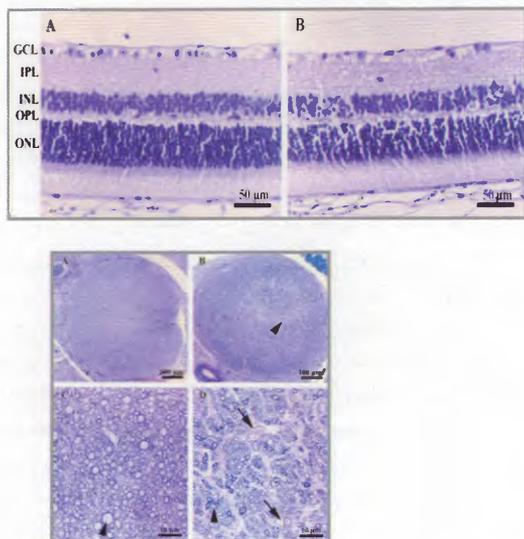


Figura 3. *Panel superior:* retinas de animales inyectados con vehículo o AH durante 10 semanas. Se observa una disminución significativa ($\cong 40\%$) en el número de células ganglionares. Hematoxilina y eosina, magnificación original $\times 200$. GCL: Capa de células ganglionares, IPL: Capa plexiforme interna, INL: Capa nuclear interna, OPL: Capa plexiforme externa y ONL: Capa nuclear externa. *Panel inferior:* Imágenes de cortes transversales del nervio óptico a baja y alta magnificación, de ojos inyectados con vehículo (A, C) y ojos tratados con AH (B, D) durante 10 semanas. En (C) se observan axones uniformes (flechas), redondos y en grupos compactos que conforman un nervio óptico sano. En el nervio óptico del ojo tratado con AH (B) se observa un área de menor tinción (flecha) que indican la alteración del nervio. A mayor magnificación (D) se observa menor densidad de fibras. Los axones del nervio tratado perdieron su estructura circular y se observa distorsión, distensión (flechas) y disminución en el número. Azul de toluidina.

Estudio de mecanismos etiopatogénicos involucrados en la neuropatía glaucomatosa

a. Excitotoxicidad glutamatérgica en el glaucoma experimental

Aunque el glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio retinal, su administración en concentraciones suprafsiológicas provoca muerte celular, particularmente de las células ganglionares retinales¹⁴. Dado que las células ganglionares son el principal *target* retinal de la hipertensión ocular, esta evidencia se ha considerado un aval (aunque indirecto) en favor de la excitotoxicidad glutamatérgica como factor causal del glaucoma. Asimismo, se ha demostrado un aumento significativo en las concentraciones vítreas de glutamato en el glaucoma humano y experimental¹⁵⁻¹⁶, aunque otros grupos no observaron cambios similares en monos o ratas con glaucoma y éste es un aspecto que ha recibido severas críticas de expertos en el área¹⁷⁻¹⁸. En todo caso, resulta limitado el punto de vista de asumir que altos niveles de glutamato en el vítreo son una condición necesaria para demostrar la participación de mecanismos de excitotoxicidad en la neuropatía glaucomatosa. En sentido estricto, el factor relevante para la neurotoxicidad es la concentración

local de glutamato a nivel de los receptores de membrana de las células ganglionares, que muy probablemente difiera en forma significativa de los niveles del neurotransmisor en el vítreo. Además, para la determinación experimental de los niveles vítreos de glutamato es necesaria la toma de muestras que debe obtenerse inevitablemente a través de un procedimiento con serios riesgos de afectar la validez del resultado. Por lo tanto, una manera más específica de evaluar los niveles sinápticos de glutamato es analizar los mecanismos que regulan este parámetro. Un *clearance* adecuado del glutamato sináptico es imprescindible para una función normal de la sinapsis excitatoria y para prevenir la neurotoxicidad. Todas las neuronas y células macrogliales de la retina expresan transportadores de glutamato de alta afinidad aunque las células de Müller son las principales responsables de la remoción de este aminoácido del espacio sináptico. En estas células, el glutamato es convertido a glutamina que, transportada a neuronas, es reconvertida en glutamato en una reacción catalizada por la enzima glutaminasa, lo que completa el ciclo glutamato/glutamina que se esquematiza en la figura 4. En este contexto, hemos analizado la actividad del ciclo glutamato/glutamina en retinas de ratas con hipertensión ocular inducida por AH. Los resultados obtenidos (fig. 4) constituyen la primera demostración experimental de cambios significativos en el reciclado de glutamato en ojos con hipertensión ocular¹⁹. En este sentido, demostramos una disminución en el influjo de glutamato (proceso que permite remover al glutamato del espacio sináptico) y en la actividad de glutamina sintetasa (enzima que cataliza la transformación de un producto potencialmente tóxico como el glutamato en un producto no tóxico como la glutamina), así como un aumento en la liberación y el transporte de glutamina y en la actividad de glutaminasa retinal (enzima que cataliza la

Ciclo glutamato/glutamina

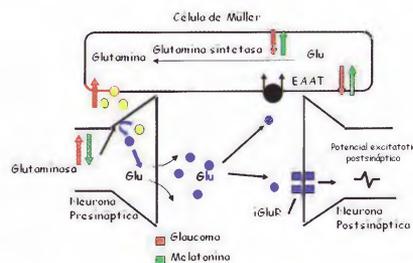


Figura 4. Representación esquemática del ciclo glutamato/glutamina retinal y el efecto de la hipertensión ocular y la melatonina como moduladores del ciclo. La hipertensión ocular disminuyó el influjo de glutamato, la actividad de glutamina sintetasa y aumentó la liberación y el influjo de glutamina y la actividad de glutaminasa. En animales intactos la melatonina modificó todos estos parámetros (salvo la liberación y el influjo de glutamina) con signo contrario al inducido por la hipertensión ocular. Glu: glutamato, iGluR: receptor pos-sináptico ionotrópico de glutamato y EAAT: transportador de glutamato.

reconversión de glutamina en glutamato) en retinas de ojos con hipertensión ocular. Estos cambios podrían contribuir en forma sinérgica y/o redundante a un aumento significativo en las concentraciones sinápticas del neurotransmisor. Por lo tanto, estos resultados avalan la participación del glutamato en la neuropatía glaucomatosa.

b. Participación del sistema GABAérgico en la retinopatía glaucomatosa

En la retina de vertebrados, el GABA (ácido γ -aminobutírico) y el glutamato son los principales neurotransmisores inhibitorios y excitatorios, respectivamente. De hecho, un ajustado balance entre ambas señales es un aspecto clave en la organización de la función retinal. Si bien resultados ya mencionados en el punto a demuestran que la excitotoxicidad por glutamato podría constituir una de las causas del daño de las células ganglionares en el glaucoma, la actividad inhibitoria retinal (esencialmente del sistema GABAérgico) no había sido previamente analizada en esta patología. En este contexto, hemos analizado la actividad del sistema GABAérgico retinal en ojos con hipertensión ocular inducida por la inyección de AH. Para ello, se inyectaron ratas semanalmente con AH en la cámara anterior de un ojo y el ojo contralateral se inyectó con vehículo. El turnover de GABA (un indicador del flujo de señales en neuronas GABAérgicas) y la actividad de la enzima glutámico descarboxilasa (GAD) (enzima que cataliza la síntesis de GABA) disminuyeron significativamente en retinas de ojos con hipertensión ocular²⁰. La liberación de GABA inducida tanto por glutamato como por alto K^+ disminuyó y el influjo de GABA aumentó significativamente en ojos tratados con AH. La unión específica de t-butil-biciclofosforotriónato (TBPS), un ligando que se une específicamente al canal de cloruro asociado al receptor GABAérgico de

tipo A aumentó significativamente en retinas de ojos hipertensos²⁰. Los resultados que se resumen en la figura 5 demuestran que la hipertensión ocular provoca un déficit significativo de la actividad GABAérgica retinal. Teniendo en cuenta que estos cambios precedieron a las alteraciones funcionales e histológicas inducidas por la hipertensión ocular, estos resultados podrían vincular causalmente al GABA con el desarrollo de la neuropatía glaucomatosa.

No se dispone de información respecto de alguna otra condición patológica retinal que hubiera sido previamente asociada a un déficit en la actividad GABAérgica. Sin embargo, se ha involucrado una disminución de la neurotransmisión GABAérgica en la fisiopatología de varios desórdenes del sistema nervioso central, particularmente en la epilepsia. En este caso, el aumento en la neurotransmisión glutamatérgica y la disminución de la transmisión GABAérgica, entre otros mecanismos, pueden desencadenar una cascada de eventos que induce muerte neuronal²¹. La excitotoxicidad es un mecanismo patogénico relativamente frecuente en enfermedades neurodegenerativas que puede atribuirse a una falla en los mecanismos compensatorios anti-excitatorios necesarios para mantener la homeostasis tisular. Estos resultados indican que la reducción del tráfico de señales inhibitorias GABAérgicas podría ser una causa adicional de este desbalance. De acuerdo con esta hipótesis, la hipertensión ocular podría provocar una prevalencia de señales excitatorias (aumento de los niveles sinápticos de glutamato) sobre señales inhibitorias (disminución de las concentraciones sinápticas de GABA), lo que a su vez podría desencadenar efectos deletéreos a nivel celular.

c. Efecto de la hipertensión ocular sobre la actividad del sistema nitrérgico retinal

Entre los posibles blancos sensibles a un exceso de señales glutamatérgicas y a una reducción del freno GABAérgico inhibitorio, el NO merece particular atención. De hecho, como ya se mencionó, diversas líneas de evidencia avalan la participación del sistema nitrérgico en la neuropatía glaucomatosa^{3, 22}. Por lo tanto, se consideró de interés examinar la actividad de este sistema en el modelo de glaucoma experimental inducido por AH. Los resultados obtenidos que se resumen en la figura 6 indican que la actividad de la enzima que cataliza la síntesis de NO, óxido nítrico sintasa (NOS), fue significativamente mayor en ojos tratados con AH respecto de los controles inyectados con vehículo²³. El influjo de L-arginina (sustrato de la NOS) y los niveles de ARNm que codifican para transportadores de L-arginina fueron significativamente mayores en retinas de ojos hipertensos (fig. 6). En suma, estos resultados indican un aumento significativo de la actividad del sistema nitrérgico retinal en ojos hipertensos y avalan la participación del NO en la neuropatía glaucomatosa²³.



Figura 5. Representación esquemática del sistema GABAérgico retinal y el efecto de la hipertensión ocular y la melatonina como moduladores del sistema. La hipertensión ocular aumentó el influjo de GABA y el binding de TBPS y disminuyó la actividad de GAD y el turnover y la liberación de GABA. En animales intactos la melatonina modificó la actividad de GAD y el turnover de GABA con signo contrario al inducido por la hipertensión ocular.

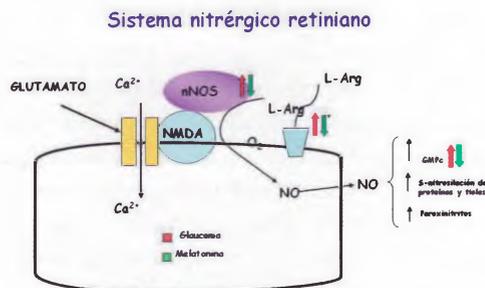


Figura 6. Representación esquemática del sistema nitrérgico retiniano y el efecto de la hipertensión ocular y la melatonina como moduladores de este sistema. La hipertensión ocular aumentó la actividad de NOS, el influjo de L-arginina y el efecto de la arginina sobre la acumulación de GMPc. En animales intactos, la melatonina inhibió la actividad de NOS retinal. NMDA: receptor glutamatérgico de tipo N-metil D-aspartato, L-Arg: L-arginina.

d. Daño oxidativo retinal inducido por la hipertensión ocular

El daño oxidativo es la consecuencia citopatológica de una generación excesiva de especies reactivas del oxígeno (ROS) que supera la capacidad celular de defensa contra la acción tóxica de estos compuestos. Evidencias crecientes avalan la participación de estas especies reactivas en un amplio rango de neuropatologías, probablemente por cambios estructurales y funcionales irreversibles que resultan del aumento en la peroxidación de ácidos grasos, ácidos nucleicos y el *cross-linking* de proteínas²⁴⁻²⁵. Los sistemas celulares disponen de mecanismos variados y normalmente eficientes para la protección contra la acumulación de estas especies reactivas. Entre estos mecanismos, las actividades de superóxido dismutasa (SOD), catalasa y glutatión peroxidasa (GPx) desempeñan un rol clave (fig. 7).

La retina es una estructura altamente susceptible al daño oxidativo debido a su alto consumo de oxígeno, su alta proporción de ácidos grasos poliinsaturados y su exposición directa a la luz visible. En este contexto, se ha sugerido que el daño oxidativo podría constituir un factor causal en el daño glaucomatoso²⁶. Para analizar esta hipótesis examinamos la actividad del sistema de defensa

Sistema de defensa antioxidante endógeno

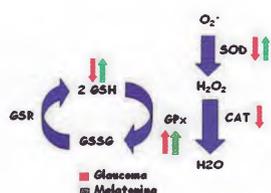


Figura 7. Sistema de defensa antioxidante y efectos de la hipertensión ocular y la melatonina sobre los distintos parámetros del sistema. La hipertensión ocular disminuyó las actividades de SOD, catalasa y los niveles de glutatión reducido. En retinas de animales intactos, la melatonina modificó significativamente varios de estos parámetros con signo contrario a la hipertensión ocular.

antioxidante retinal en ratas con hipertensión ocular crónica inducida por AH. Los resultados obtenidos, que se resumen en la figura 7, indican un déficit significativo en la capacidad antioxidante retinal en este modelo experimental. En este sentido, demostramos una caída significativa de la actividad de catalasa y de superóxido dismutasa (SOD) y de los niveles de glutatión reducido en retinas de ojos hipertensos²⁷. Estos resultados indican una disfunción de la actividad del sistema de defensa antioxidante en retinas de ojos con hipertensión ocular. Esta hipótesis es avalada por el incremento en la peroxidación lipídica retinal que aumentó significativamente en retinas de ojos con hipertensión inducida por AH²⁷. Asimismo, los niveles retinales de melatonina (un compuesto con probadas propiedades antioxidantes a nivel local) disminuyeron significativamente en ojos inyectados con AH, ya a partir de etapas tempranas de hipertensión ocular²⁷. Estos resultados demuestran un déficit significativo en la actividad del sistema de defensa antioxidante endógeno en retinas con hipertensión ocular. Estos cambios fueron evidentes en períodos tempranos de tratamiento y se iniciaron aún antes de que se evidencien los cambios funcionales e histológicos asociados a la hipertensión ocular. Por lo tanto, es posible que la injuria oxidativa (eventualmente en forma conjunta con el aumento de la actividad glutamatérgica y nitrérgica, así como un déficit GABAérgico, ya mencionados) constituya un factor causal en el daño retinal inducido por la hipertensión.

Efecto de la melatonina como herramienta terapéutica de prevención de las alteraciones funcionales e histológicas inducidas por la hipertensión ocular crónica

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

- i) Reproducir en condiciones controladas y con la mayor exactitud posible las características patognomónicas de la enfermedad que se pretende modelar,
- ii) Elucidar los mecanismos etiopatogénicos involucrados en el desarrollo de la enfermedad,
- iii) Desarrollar terapias de nueva generación.

Habiendo satisfecho el primer aspecto y luego de haber logrado avances de consideración en el segundo de ellos, la continuación de este trabajo consistió en analizar una nueva estrategia terapéutica para el tratamiento del glaucoma. El conjunto de resultados ya presentados permite postular 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. 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

Actividad electroretinográfica en animales inyectados con AH durante 6 ó 10 semanas

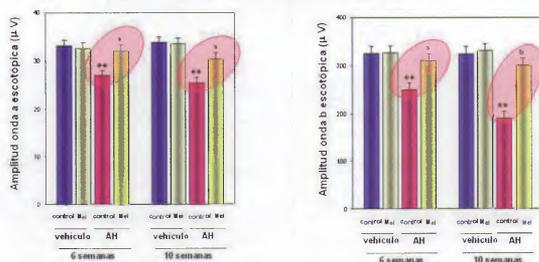
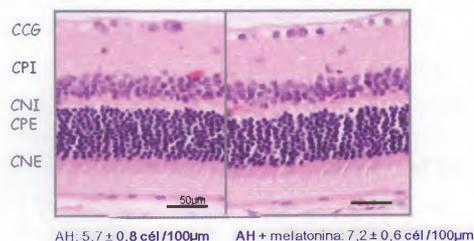


Figura 8. Efecto de la melatonina sobre la amplitud de las ondas a y b del ERG escotópico en animales con hipertensión ocular. *Panel izquierdo:* Amplitud de la onda a del ERG. El tratamiento con melatonina redujo la magnitud de la caída de este parámetro en ojos hipertensos. Este efecto se observó tanto a las 6 como a las 10 semanas de hipertensión ocular. *Panel derecho:* Amplitud de la onda b. El tratamiento con melatonina redujo la magnitud de la caída de este parámetro en ojos hipertensos. Este efecto se observó tanto a las 6 como a las 10 semanas de hipertensión ocular. No se observaron diferencias significativas en las latencias de las ondas a y b entre los grupos experimentales. Se representan las medias \pm ES ($n = 8$ ojos/grupo). ** $p < 0,01$ respecto de ojos inyectados con vehiculo en animales no tratados con melatonina, test de Tukey. a: 0,01 y b: 0,05 vs. animales inyectados con AH sin *pellet* de melatonina.

los posibles mecanismos etiopatogénicos involucrados en esta neuropatía óptica. Para ello se examinó el efecto de la melatonina sobre algunos de los componentes del ciclo glutamato/glutamina. La melatonina, en concentraciones nanomolares, aumentó significativamente el influjo de L-³H-glutamato y la actividad de glutamina sintetasa retinal y disminuyó la conversión de glutamina a glutamato (fig. 4). Con el objeto de analizar el efecto de la melatonina sobre el sistema GABAérgico retinal se determinó el efecto de la inyección intravítrea de melatonina sobre el *turnover* de GABA y la actividad de GAD. La melatonina aumentó significativamente ambos parámetros (fig. 5). Para analizar el efecto de la melatonina sobre la actividad del sistema nitrérgico retinal se examinó el efecto *in vitro* del metoxiindol sobre la síntesis de NO. La melatonina disminuyó significativamente la conversión de L-³H-arginina en L-³H-citrulina (fig. 6). A continuación se examinó el efecto de la melatonina sobre la actividad del sistema de defensa antioxidante endógeno retinal. Los resultados obtenidos indican que la melatonina aumentó significativamente la actividad de SOD, no modificó la actividad retinal de catalasa pero incrementó significativamente la actividad de GPx y los niveles de glutatión reducido (fig. 7) y disminuyó la peroxidación lipídica retinal. Este conjunto de evidencias indican que en los sistemas estudiados, la melatonina provoca mayoritariamente efectos de signo opuesto a los inducidos por la hipertensión ocular, lo que podría sugerir el uso de este metoxiindol con fines terapéuticos en el glaucoma. Para analizar esta hipótesis se implantó cada 15 días un *pellet* subcutáneo de 30 mg de melatonina antes de la primera inyección de AH y se analizaron los ERGs es-

Efecto del tratamiento con melatonina sobre la histología retiniana luego de 10 semanas de hipertensión ocular



AH: $5,7 \pm 0,8$ cél/100µm AH + melatonina: $7,2 \pm 0,6$ cél/100µm

Figura 9. Secciones transversales de la retina de un animal no tratado con melatonina e inyectado durante 10 semanas con AH y de un ojo de un animal con hipertensión ocular implantado con un *pellet* subcutáneo de melatonina. En el animal tratado con melatonina el número de células de la capa de células ganglionares (CCG) fue significativamente mayor. Tinción con hematoxilina y eosina, magnificación original X 200. CPI: Capa plexiforme interna, CNI: Capa nuclear interna, CPE: Capa plexiforme externa y CNE: Capa nuclear externa.

cotópicos a diferentes períodos de hipertensión ocular. La implantación del *pellet* de melatonina revirtió los cambios funcionales observados en el electroretinograma de ratas tratadas con AH, tanto a las seis como a las diez semanas (fig. 8). En cuanto a los cambios histológicos, el tratamiento con melatonina disminuyó significativamente la pérdida de células de la capa de células ganglionares inducida por hipertensión ocular (fig. 9).

Consecuencias conceptuales de los resultados y perspectivas futuras

Aunque no se dispone de estadísticas actualizadas en nuestro país, el glaucoma es, probablemente, una de las enfermedades que más frecuentemente requieren de tratamiento oftalmológico. La terapéutica farmacológica actualmente en uso para esta enfermedad es onerosa, dado que la medicación es costosa en sí misma y debe aplicarse en forma indefinida. Además, 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. El glaucoma es una patología compleja con varios factores de riesgo, en la que probablemente convergen diversos mecanismos en la inducción de muerte celular. La terapéutica contemporánea está esencialmente destinada a disminuir la PIO. Sin embargo, diversas evidencias experimentales y clínicas indican que la pérdida visual persiste luego de su restauración a valores normales. Por lo tanto, la terapia de nueva generación aspira a incluir *neuroprotectores* que puedan ser utilizados como herramientas complementarias con otros medicamentos diseñados para disminuir el insulto inicial (esencialmente hipotensores oculares).

El conjunto de resultados presentados en este trabajo señalan a la administración de melatonina como una posible estrategia de significación en la terapia del glaucoma. Esta hipótesis adquiere una dimensión adicional si se considera que los niveles retinales de este metoxiindol disminuyen significativamente en animales inyectados con AH desde etapas tempranas de hipertensión ocular. Asimismo, una ventaja adicional para ello, es que este compuesto probadamente carece de efectos tóxicos aún en altas concentraciones. Si bien quedan aún muchos aspectos por analizar (las dosis óptimas, las vías de administración, la efectividad de la combinación de melatonina con hipotensores oculares y fundamentalmente la posibilidad del uso de melatonina con fines no sólo preventivos, sino también de utilidad terapéutica en etapas más tardías de la neuropatía), el conjunto de resultados obtenidos 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.

Conclusiones

- La administración intracameral aguda de AH produce una hipertensión ocular significativa.
- La administración crónica de AH induce una hipertensión ocular persistente.
- El tratamiento crónico con AH induce alteraciones funcionales e histológicas compatibles con el glaucoma humano.
- La hipertensión ocular inducida por AH provoca una alteración significativa en la actividad del ciclo glutamato/glutamina retinal.
- La hipertensión ocular inducida por AH provoca un déficit de la actividad GABAérgica retinal.
- La hipertensión ocular inducida por AH provoca una activación del sistema nitrérgico retinal.
- La hipertensión ocular inducida por AH provoca una disminución de la actividad del sistema de defensa antioxidante endógeno.
- La administración intracameral de AH provoca una disminución significativa en la síntesis retinal de melatonina.
- La melatonina podría disminuir las concentraciones sinápticas de glutamato, aumentar la actividad GABAérgica, inhibir el sistema nitrérgico y disminuir el daño oxidativo retinal.
- El tratamiento crónico con melatonina previene las alteraciones funcionales inducidas por hipertensión ocular.
- El tratamiento crónico con melatonina disminuye la

vulnerabilidad de las células ganglionares retinales frente a los efectos deletéreos de la hipertensión ocular.

Referencias

1. Vorwerk CK, Gorla MS, Dreyer EB. An experimental basis for implicating excitotoxicity in glaucomatous optic neuropathy. *Surv Ophthalmol* 1999; 43 (Suppl 1): S142-50.
2. Quigley HA. Neuronal death in glaucoma. *Prog Retin Eye Res* 1999; 18: 39-57.
3. 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 USA* 1999; 96: 9944-8.
4. 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.
5. Francois J, Benozzi G, Victoria-Troncoso V, Bohyn W. Ultrastructural and morphometric study of corticosteroid glaucoma in rabbits. *Ophthalmic Res* 1984; 16: 168-78.
6. Acott TS, Westcott M, Passo MS, Van Buskirk EM. Trabecular meshwork glycosaminoglycans in human and cynomolgus monkey eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1985; 26: 1320-29.
7. Knepper PA, Farbman AI, Telser AG. Exogenous hyaluronidases and degradation of hyaluronic acid in the rabbit eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1984; 25: 286-93.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. Ueda J, Sawaguchi S, Hanyu T, Yaoeda K, Fukuchi T, Abe H, Ozawa H. Experimental glaucoma model in the rat with laser trabecular photocoagulation after intracameral injection of India ink. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi* 1998; 102: 239-46.
12. 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.
13. Moreno MC, Marcos HJ, Croxatto OJ, 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* 2005; 81: 71-80.
14. Chiu K, Lam TT, Ying Li WW, Caprioli J, Kwong Kwong JM. Calpain and N-methyl-D-aspartate (NMDA)-induced excitotoxicity in rat retinas. *Brain Res* 2005; 1046: 207-15.
15. Dreyer E, Zurakowski D, Schumer R. Elevated glutamate levels in the vitreous body of humans and monkeys with glaucoma. *Arch Ophthalmol* 1996; 114: 299-305.
16. Dreyer EB, Grosskreutz CL. Excitatory mechanisms in retinal ganglion cell death in primary open angle glaucoma (POAG). *Clin Neurosci* 1997; 4: 270-73.
17. Honkanen RA, Baruah S, Zimmerman MB, Khanna CL, et al. Vitreous amino acid concentrations in patients with glaucoma undergoing vitrectomy. *Arch Ophthalmol* 2003; 121: 183-8.
18. Wamsley S, Gabelt BT, Dahl DB, Case GL, Sherwood RW, May CA, Hernandez MR, Kaufman PL. Vitreous glutamate concentration and axon loss in monkeys with experimental glaucoma. *Arch Ophthalmol* 2005; 123: 64-70.
19. 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*. 2005; 19: 161-62.
20. 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.
22. Wang X, Ng YK, Tay SS. Factors contributing to neuronal degeneration in retinas of experimental glaucomatous rats. *J Neurosci Res*. 2005; 82: 674-89.
21. Pena F, Tapia R. Seizures and neurodegeneration induced by 4-aminopyridine in rat hippocampus in vivo: role of glutamate- and GABA-mediated

- neurotransmission and of ion channels. *Neuroscience* 2000; 101: 547-61.
23. Belforte N, Moreno MC, Cymering C, Bordone M, Keller Sarmiento MI, Rosenstein RE. Effect of ocular hypertension on retinal nitridergic pathway activity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; 48: 2127-33.
 24. Wu, GS, Zhang, J, Rao, NA. Peroxynitrite and oxidative damage in experimental autoimmune uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997; 38: 1333- 39.
 25. Tanito M, Nishiyama A, Tanaka T, Masutani H, Nakamura H, Yodoi J, Ohira A. Change of redox status and modulation by thiol replenishment in retinal photooxidative damage. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43: 2392-400.
 26. Kurysheva NI, Vinetskaia MI, Elichev 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.
 27. Moreno MC, Campanelli J, Sande P, Sáñez DA, Keller Sarmiento MI, Rosenstein RE. Retinal oxidative stress induced by high intraocular pressure. *Free Radic Biol Med* 2004; 37: 803-12.

Anuncios

Próximos números temáticos de *Oftalmología Clínica y Experimental*

La revista OFTALMOLOGÍA CLÍNICA Y EXPERIMENTAL invita al envío de trabajos originales y comunicaciones breves sobre los siguientes temas que serán publicados en los próximos números de la misma.

Tema: Catarata y cirugía refractiva

Coordinador: Dr. Daniel Badoza

Fecha límite de envíos de trabajos: 1º de septiembre de 2009.

Fecha de publicación: volumen 3, no. 3, diciembre de 2009.

Tema: Estudios epidemiológicos en oftalmología

Coordinador: Dr. Van C. Lansingh

e-mail: vlansingh@v2020la.org

Fecha límite de envíos de trabajos: 1º de abril de 2010.

Fecha de publicación: volumen 4, no. 1, junio de 2010.

Premio al mejor trabajo publicado en *Oftalmología Clínica y Experimental*

El Comité Ejecutivo del Consejo Argentino de Oftalmología y el Comité Editor de la revista OFTALMOLOGÍA CLÍNICA Y EXPERIMENTAL han establecido el "Premio al Mejor Trabajo Publicado en *Oftalmología Clínica y Experimental*" correspondiente a cada nuevo volumen de la misma. El premio correspondiente a los volúmenes 1 y 2 será dado a conocer y entregado en las Jornadas Nacionales de Oftalmología CAO 2009 que se realizarán del 21 al 23 de mayo de 2009 en el Hotel Hilton Buenos Aires.