

# Efecto protector del azul de metileno en la Retinopatía del Prematuro experimental



**Autores:** Rey-Funes M.<sup>(1)</sup>, Fernández J.C.<sup>(2)</sup>, Ibarra M.E.<sup>(1)</sup>, Peña E.<sup>(1)</sup>, Contartese D. S.<sup>(1)</sup>, Inserra P.F.<sup>(3)</sup>, López-Costa J.J.<sup>(1)</sup>, Dorfman V.B.<sup>(1)</sup>, Loidl C.F.<sup>(3)</sup>.

(1) Instituto de Biología Celular y Neurociencia "Prof. E. De Robertis" (IBCyN), Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

(2) Primera Cátedra de Farmacología. Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

(3) Centro de Estudios Biomédicos, Biotecnológicos, Ambientales y Diagnóstico (CEBBAD), Universidad Maimónides.

Autor responsable: Dr. Manuel Rey Funes

Laboratorio de Neuropatología Experimental, Instituto de Biología Celular y Neurociencia "Prof. E. De Robertis" (IBCyN), Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

Paraguay 2155 3º piso. Ciudad de Buenos Aires.

e-mail: manuel.reyfunes@gmail.com

## Resumen

**Introducción:** La hipoxia-isquemia por asfisia perinatal (AP) es causa de lesiones en la retina, pudiendo llevar a la ceguera por retinopatía proliferativa isquémica (RPI). En estudios previos hemos demostrado neurodegeneración, gliosis y neovascularización compatibles con la ROP, e identificado que el sistema nitrérgico está involucrado en su fisiopatología.

**Objetivos:** Analizar la aplicación de azul de metileno como potencial estrategia terapéutica, dado que inhibe a la enzima óxido nítrico sintasa.

**Métodos:** Se estudió la actividad enzimática y expresión de nNOS mediante Western blot, histoquímica de NADPHd e inmunohistoquímica contra nNOS, en la retina de animales de 30 días en un modelo de AP.

**Resultados:** Se observó que a los 30 días postnatal, la nNOS aumenta significativamente su actividad y expresión en aquellos animales sometidos a AP al ser comparados con el grupo control (CTL). En el grupo AP tratado con azul

## Summary:

**Introduction:** Hypoxia-ischemia by perinatal asphyxia (PA) is cause of retinal lesions, and can produce blindness by ischemic proliferative retinopathy (IPR). Previously, we have demonstrated retinal neurodegeneration, gliosis and neovascularization. Furthermore, we have identified the involvement of the nitregic system in it physiopatology.

**Objectives:** Studying the participation of nitric oxide (NO) through the neuronal isoform of the enzyme nitric oxide synthase (nNO) as trigger of the structural and molecular alterations previously observed by our group of research, and analyzing the application of methylene blue (MB) a therapeutic strategy.

**Methods:** The studies were performed in retina by using enzymatic activity, NADPHd histochemical method and immunohistochemistry against nNOS. The studies were applied in three different groups (control, PA and MB) of 30 postnatal day animals.

de metileno (AZM) no se encontraron diferencias significativas en la actividad de NOS constitutiva con respecto al grupo CTL, mientras que su expresión evaluada por western blot fue menor. Los estudios realizados con histoquímica para NADPHd e inmunohistoquímica contra nNOS refuerzan estos resultados.

**Conclusiones:** El NO es un radical libre que participa como neurotóxico en el desarrollo de la ROP por AP. La aplicación de azul de metileno como estrategia terapéutica, tiene un potente efecto bloqueante en la actividad de la enzima NOS constitutiva, y en la expresión de la misma. Este hallazgo alienta estudios futuros más exhaustivos para evaluar el uso del azul de metileno con el fin de atenuar o evitar el daño retiniano.

**Palabras clave:** retina - óxido nítrico - modelo experimental - ROP - azul de metileno

## Introducción

La asfisia perinatal (AP), es una afección que induce un estado de hipoxia-isquemia global en el SNC, que puede producir secuelas cuya gravedad es dependiente de la severidad y el tiempo en que se mantiene la falta de oxígeno. Entre las secuelas más comunes se destacan el Síndrome de Déficit de Atención e Hiperactividad<sup>(1)</sup>, epilepsias, retardo mental, la parálisis cerebral o espasticidad; alteraciones auditivas y visuales<sup>(2)</sup>. Entre las últimas, la retina es particularmente sensible, siendo sus capas más internas (limitante interna, fibras del nervio óptico, células ganglionares, plexiforme interna y nuclear interna) las más afectadas<sup>(3)</sup>. En casos severos, pueden desarrollarse retinopatías e incluso la ceguera. En nuestro laboratorio, utilizamos un modelo experimental de AP, con una histopatología compatible con la descripción de retinopatía proliferativa isquémica (RPI), caracterizada por presentar neovascularización e hipertrofia glial de las células de Müller en la retina interna<sup>(3)</sup>, como se observa en diferentes afecciones tales como diabetes mellitus, oclusión de venas retinales y retinopatía del prematuro (ROP)<sup>(4)</sup>, que es la principal causa de ceguera evitable en niños<sup>(5,6,7)</sup>. Numerosos mecanismos han sido involucrados en el daño neuronal por AP, entre los que la liberación de óxido nítrico (NO) juega un papel relevante<sup>(8)</sup>. Su liberación se produce como respuesta a una sobreactivación de receptores NMDA y AMPA glutamatérgicos<sup>(9)</sup>, lo que genera un incremento del influjo de calcio y

**Results:** At 30 postnatal day, we observed a significant increase of nNOS activity and expression in retinas of those animals subjected to PA, when compared with the control group. In the group treated with methylene blue we did not found significant differences in constitutive NOS activity, meanwhile its expression evaluated by western blot was lower than controls. The histochemical and immunohistochemical studies support these results.

**Conclusions:** NO, is a free radical that acts as a neurotoxic agent, seems to have a crucial role in the development of ROP after PA. The application of methylene blue as a therapeutic strategy showed a strong protective effect inhibiting the constitutive NOS activity and its expression. This finding stimulates future studies with the aim of using MB in order to avoid or decrease retinal damage.

**Key words:** retina - nitric oxide - ROP - experimental model - methylene blue

sodio y en consecuencia la liberación de NO por activación de la óxido nítrico sintasa (NOS). Esta presenta 2 isoenzimas constitutivas denominadas nNOS y eNOS y una inducible, iNOS. La nNOS es calcio-calmodulina dependiente, y se activa a medio y largo plazo, generando especies reactivas del oxígeno (ROS), al igual que la iNOS. La eNOS genera a corto plazo vasodilatación en respuesta a la hipoxia-isquemia<sup>(10,11,12)</sup>.

El NO es causante de daño cerebral durante la isquemia, dado que las ROS inducen la activación de lipasas, fosfolipasas, proteasas y proteína-quinasas<sup>(13,14)</sup> y dado que la retina es rica en ácidos grasos rápidamente peroxidables, la hace particularmente vulnerable al daño oxidativo<sup>(15,16,17,18)</sup>. En nuestro modelo hemos observado un significativo aumento de la expresión de NO en retinas isquémicas en neuronas amácrinas, horizontales, ganglionares y células de Müller. El NO, entonces, genera nitrosilación proteica desencadenando neurotoxicidad<sup>(12)</sup>. Por otra parte, se ha demostrado que la activación del factor de transcripción inducible por la hipoxia (HIF) por sus heterodímeros, Hif-1 $\alpha$  (citoplasmático) y Hif-1 $\beta$  (nuclear) se unen activando numerosos genes entre los cuales se encuentran los que codifican para la NOS<sup>(18)</sup>.

El tratamiento más efectivo para las afecciones producidas por la AP sería la prevención, sin embargo, dadas las causas que la provocan, es imprescindible la evaluación de estrategias terapéuticas que prevengan

el daño neurológico y oftalmológico a largo plazo, entre las cuales se propone la utilización de azul de metileno (AM).

El AM es el cloruro de tetrametilitionina, un derivado de la fenotiacina con diversos usos en diagnóstico y tratamiento (metahemoglobinemia) <sup>(19)</sup>. El AM actúa como una sustancia reductora antioxidante por su capacidad de aceptar electrones. Acepta electrones provenientes de NAD y FAD que los transfieren al oxígeno por vía no enzimática <sup>(20)</sup>. El AM intracelular reducido puede oxidarse en presencia de oxígeno molecular <sup>(21)</sup>. También se observó que AM inhibe las enzimas NADPH-oxidasa y mieloperoxidasa <sup>(22)</sup>. En el daño oxidativo sobre la membrana celular, el AM actuaría en forma competitiva con el oxígeno molecular por las oxidasas tisulares <sup>(23,24)</sup> y su consecuente reducción a superóxido. El AM se oxida a leucod-derivados eliminándose como leucometileno por orina, bilis, heces y otras secreciones <sup>(25)</sup>. La dosis tóxica mínima de AM es de 5mg/kg i.v. provocando anemia, hiperbilirrubinemia y reticulocitosis.

### Objetivo

Analizar la aplicación de azul de metileno (AM) como potencial estrategia terapéutica para lograr inhibir la actividad de la enzima óxido nítrico sintasa, desencadenante de las alteraciones estructurales de la retina generadas por la asfixia perinatal.

### Materiales y Métodos

Modelo de desarrollo de RPI por asfixia perinatal (AP):  
Animales

En todos los casos se utilizaron ratas de la cepa Sprague-Dawley, con calidad genética y sanitaria certificada en el bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires.

**Inducción de la asfixia:** Se utilizaron ratas preñadas (n = 13) en el último día de gestación (22 días). De estas, 4 fueron destinadas para obtener crías controles, 4 cuyas crías fueron sometidas a asfixia perinatal (AP) severa y las restantes 5 recibieron azul de metileno (2mg/kg), aplicado i.p. en 2 dosis, 30 y 5 minutos antes de la inducción de AP. Las mismas fueron anestesiadas con hidrato de cloral 28% P/V (0.1ml/100g/peso); y rápidamente histerectomizadas. Posteriormente, los fetos aún contenidos dentro del

útero extirpado, se sumergieron durante 20 minutos en agua a 37°C (asfixia perinatal severa, AP).

Inmediatamente luego de la AP, los fetos fueron extraídos del útero, secados de sus fluidos y estimulados manualmente a respirar.

Se procedió entonces a ligar el cordón umbilical de los recién nacidos, y se mantuvieron bajo observación durante 40-80 minutos. Los sobrevivientes fueron colocados con una rata madre sustituta (la cual tuvo cría normalmente el mismo día), reemplazando parte de sus recién nacidos por los experimentales asfícticos no tratados y tratados con AM, previamente identificados. Se consideraron animales experimentales únicamente aquellos que cumplieron con una longitud occipitocaudal > 41 mm; y peso > 5 g. En el presente estudio se utilizaron solamente ratas macho para evitar la influencia de los estrógenos, generándose los siguientes grupos experimentales: a) Controles (CTL); b) AP durante 20 minutos a 37°C (AP) y c) AP durante 20 minutos a 37°C, con aplicación previa de AM.

El modelo animal utilizado ha sido aprobado por Comités de Ética para el manejo de animales de experimentación del país y del extranjero: por UBA (CICUAL), Buenos Aires, Argentina, por el del Karolinska Institutet, Estocolmo, Suecia y por el del Akademisch Ziekenhuis Maastricht (AzM), Maastricht, Países Bajos.

**Obtención del tejido:** Cuando los 3 grupos cumplieron 30 días de edad, los animales fueron anestesiados con hidrato de cloral 28% P/V (0.1ml/100g/peso) por vía intraperitoneal, sacrificados y enucleados. Luego, se descartaron los polos anteriores de los ojos y los cristalinos, para facilitar la fijación de los polos posteriores que contienen las retinas. La fijación se realizó por inmersión de las mismas en una solución de paraformaldehído al 4% en buffer fosfato 0,1M pH 7,4 por 24 horas a 4°C. Luego se procedió con el material de estudio de la siguiente manera:

### Procesamiento de los tejidos para Microscopía Óptica (M.O.)

**Histoquímica e Inmunohistoquímica:** Los bloques de tejido fueron crioprotectados en sacarosa al 10%, 20% y 30% durante 3 días sucesivos. Los bloques fueron posteriormente embebidos en Tisseu tec®, congelados a -70°C y cortados en secciones de 20 µm de espesor con un crióstato Leitz "Lauda". Las mismas se

montaron en portaobjetos que previamente se incluyeron en gelatina al 3% y se procesaron para las siguientes técnicas:

#### **Inmunohistoquímica: Técnica de**

**Peroxidasa-antiperoxidasa (PAP).** Detalles de esta técnica se pueden encontrar en Sternberger & Sternberger's PAP, 1986 (26).

Se utilizaron como anticuerpos (Ac) primarios: Ac anti-nNOS (isoforma neuronal de la enzima óxido nítrico sintasa), anticuerpo policlonal de conejo en una dilución de 1:1000 (27).

#### **Histoquímica: Técnica de**

##### **Nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato diaforasa**

Permite verificar en forma indirecta, la presencia de la enzima NOS, ya que el NADPH es su cofactor. La técnica consiste en la combinación de NADPH-d 1mg/ml y el colorante nitroblue de tetrazolio 0.1 mg/ml. Luego las secciones fueron incubadas en una estufa a 37°C durante un período de 1-2 horas. Se realizaron 2 lavados de 5 minutos con PBS para eliminar el exceso de colorante. Posteriormente, los portaobjetos fueron montados utilizando PBS/glicerol. El grado de reacción fue monitoreado mediante M.O (28, 29, 30)

##### **Obtención del tejido para Actividad enzimática y Western Blot.**

Se extrajeron las retinas, se pesaron y luego fueron colocadas en tubos Eppendorf. Inmediatamente los tejidos fueron congelados sobre hielo seco y conservados en un congelador de -70°C hasta su homogenización.

##### **Procesamiento del tejido para actividad**

**enzimática de la NOS.** Esta técnica se basa en la medida indirecta de la concentración de óxido nítrico a través de la medición de la actividad enzimática de la proteína óxido nítrico sintasa (NOS) (31, 32).

##### **Procesamiento del tejido para Western blot.**

Se siguió el procedimiento descrito por Rodrigo, 2001 (45). Se homogeneizaron en buffer RIPA con agregado de inhibidores de proteasas y se centrifugará 30 minutos a 15,000 rpm. Se guardó el sobrenadante a -70°C para estudio de proteínas celulares totales. Mediante la técnica de Bradford se determinó la concentración de proteínas. Las proteínas se separaron electroforéticamente en geles de acrilamida-bisacrilamida al 7,5%. Todas las calles del gel fueron cargadas con la misma cantidad de proteínas verificándose posteriormente con anticuerpo anti  $\beta$ -actina. Las proteínas fueron transferidas electroforéticamente a una membrana de nitrocelulosa que se bloqueó con leche descremada e incubó toda la

noche con los anticuerpos primarios dirigidos contra nNOS. Luego se incubó con anticuerpo secundario unido a HRP (Sigma) para ser revelado por quimioluminiscencia (ECL Western Blotting Detection System, Amersham).

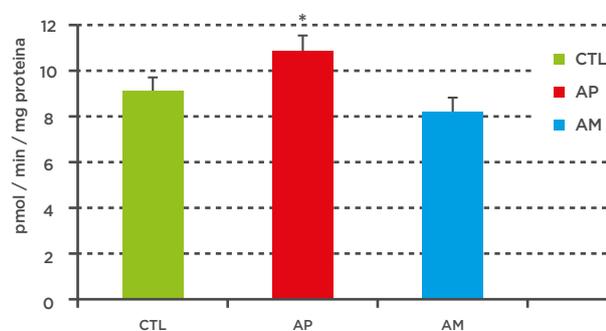
**Análisis de imágenes y estadística.** Las imágenes obtenidas por microscopía óptica, así como las bandas de proteínas obtenidas en los Western Blots, fueron analizadas mediante un programa de análisis por imágenes computarizado (ScionImage). Se determinó la densidad óptica relativa (DOR) mediante inmunomarcación para nNOS, Área y Número de células ganglionares y amácrinas Inmunorreactivas para nNOS en secciones de retina de 400  $\mu$ m de largo. Se determinó la densidad óptica relativa (DOR) mediante marcación para NADPH-diaforasa, Área y Número de células amácrinas reactivas para NADPH-diaforasa en secciones de retina de 400  $\mu$ m de largo.

Todas las determinaciones fueron evaluadas por análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguidos de test de Fisher. Las diferencias fueron consideradas significativas para un valor de  $p < 0,05$ .

## **Resultados**

### **Actividad enzimática de la NOS constitutiva:**

En homogenatos de retinas de 30 días se observó que la actividad enzimática para NOS constitutiva se incrementa significativamente en el grupo AP (10,85  $\pm$  0,4 pmol/min/mg de proteína) vs. CTL (9,07  $\pm$  0,3 pmol/min/mg de proteína), y con un descenso significativo en el grupo AM (8,21  $\pm$  0,2 pmol/min/mg de proteína) vs. CTL (Figura 1).



**Figura 1.** Actividad enzimática de la NOS constitutiva. Se observa aumento significativo en el grupo AP con respecto a CTL; y sin que haya cambios significativos en AM vs. CTL.

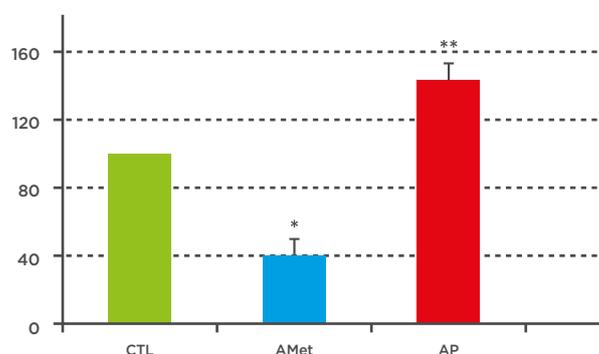
**Western blot: Expresión de nNOS:**

Se evaluaron homogenatos de retina de animales CTL, AP y AM de 30 días. Sobre las bandas de inmunorreactividad para nNOS correspondientes a 155 kDa, se midió la densidad óptica relativa (densitometría), obteniéndose un aumento significativo de 28% en AP respecto al CTL. En el grupo tratado con AM se evidenció una reducción significativa de 60% en la expresión de esta proteína con respecto al CTL.

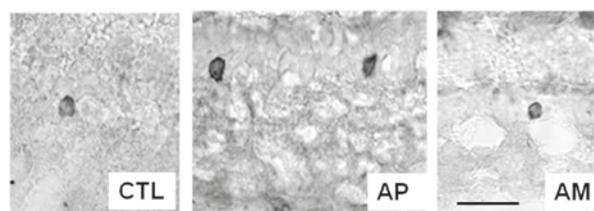
**Histoquímica para Nicotinamida - Adenina - Dinucleótido - fosfato - diaforasa (NADPH-d)**

En todas las secciones de retinas de los diferentes grupos se observó reacción NADPH-d positiva en los somas de las neuronas amácrinas de la capa nuclear interna, así como en sus prolongaciones en la capa plexiforme interna (Figura 3a).

Las retinas del grupo AP presentaron un aumento significativo del 50% en el número de neuronas amácrinas con reacción positiva a NADPH-d por campo comparado con el grupo CTL (Figura 3b). Además, estas células presentaron mayor densidad óptica relativa (D.O.R) con un aumento significativo del 33% en AP vs. CTL, así como un aumento significativo del 13% en el área celular y un aumento significativo del 26% en el área reactiva (Figura 3b). En las retinas del grupo AM no se observaron cambios significativos respecto al CTL en cuanto al área celular, área reactiva, o D.O.R.. Sólo se evidenció una disminución significativa del 25% en el número de neuronas amácrinas por campo en el grupo AM respecto al CTL (Figura 3b).



**Figura 2.** Expresión de nNOS. Se observan aumentos significativos en el grupo AP con respecto a CTL; y una disminución significativa en AM vs. CTL.



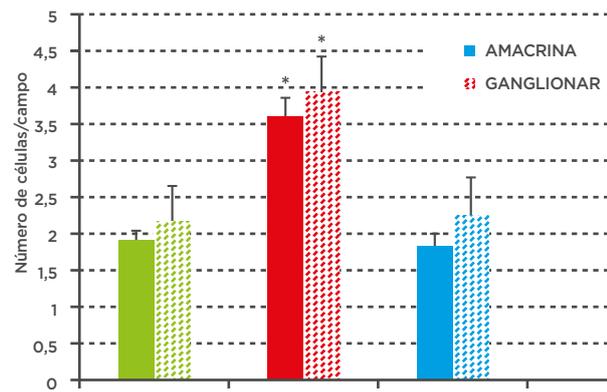
**Figura 3a.** Histoquímica para NADPH-diaforasa. Se observó reacción positiva en la capa plexiforme interna y en las neuronas amácrinas. Nótese una mayor reactividad en la capa plexiforme interna, mayor reactividad y número de neuronas teñidas por campo en la capa nuclear interna y la tinción de vasos en IR de animales AP. Barra = 30 μ

D.O.R. (área reactiva)	Área Reactiva (μ <sup>2</sup> )	D.O.R. (área celular)	Área Celular (μ <sup>2</sup> )	Número de células/campo	
0,48±0,07	54,01±2,35	0,45±0,16	84,52±2,02	2,00±0,20	CTL
0,63±0,04*	68,68±1,89*	0,60±0,05*	95,14±1,52*	3,07±0,18*	AP
0,49±0,36	55,22±3,48	0,48±0,13	89,14±2,71	1,49±0,16*	AM

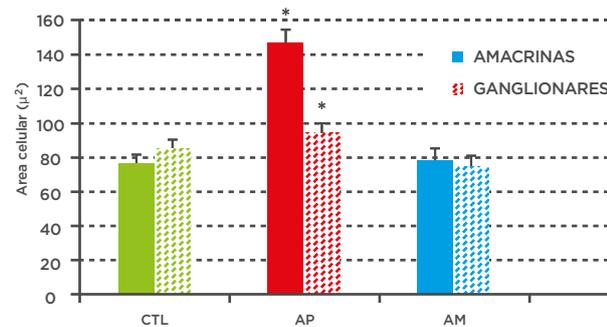
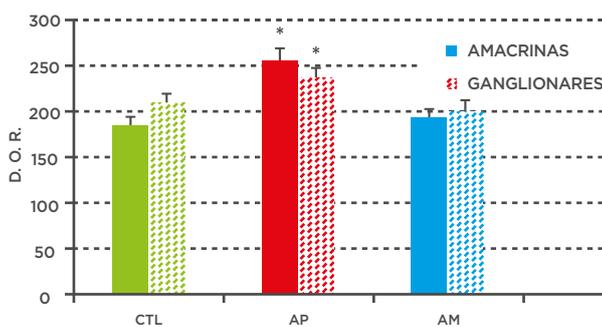
**Figura 3b.** Determinación de parámetros morfométricos de células amácrinas. Retinas de animales de los tres grupos experimentales teñidas con la técnica de NADPH-diaforasa, fueron analizadas utilizando un programa de análisis morfométrico (Scion-Image) y los resultados fueron evaluados en forma estadística (ANOVA). Se utilizaron retinas de tres animales por grupo experimental, analizándose 6-7 secciones por animal. Los valores representan la media ± el error estándar. \* p<0.05.

## Inmunohistoquímica: Anticuerpo contra la Óxido Nítrico Sintasa neuronal (nNOS)

Las retinas de 30 días del grupo AP presentaron un aumento en la inmunorreactividad para nNOS, en somas de neuronas amácrinas y ganglionares, y en la capa plexiforme interna, donde se encuentran las prolongaciones dendríticas de las neuronas amácrinas, con respecto al CTL (Figura 4). Mediante estudios morfométricos se evidenció un aumento significativo del 75% en el número de células amácrinas por campo, del 73% en su D.O.R. y del 100% en el área celular en AP comparados con el grupo CTL (Figura 4 y 5). En el caso de las células ganglionares se determinó un aumento significativo del 81% en el número de células por campo, del 15% en su D.O.R. y del 7% en el área celular de AP respecto al grupo CTL (Figura 4 y 5). El grupo AM no mostró cambios significativos respecto al CTL en ninguno de los parámetros estudiados en ambos tipos celulares (Figura 4 y 5).



**Figura 4.** Inmunohistoquímica para nNOS. Nótese reacción positiva en las neuronas amácrinas y en las neuronas ganglionares. Se observaron cambios significativos en la D.O.R. y en el área celular de neuronas amácrinas y ganglionares del grupo AP vs. CTL. No se observaron cambios significativos en AM con respecto a CTL. Barra= 30  $\mu$



**Figura 5.** Inmunohistoquímica para nNOS. Se observaron cambios significativos en la D.O.R. y en el área celular de neuronas amácrinas y ganglionares del grupo AP vs. CTL. No se observaron cambios significativos en AM con respecto a CTL.

## Conclusiones

- (1) El NO es un importante agente neurotóxico en el desarrollo de RPI por AP.
- (2) A los 30 días de la AP se observó un aumento significativo de la actividad enzimática de la NOS constitutiva y de la expresión de la nNOS.
- (3) A los 30 días de la AP, la nNOS se encuentra aumentada significativamente en neuronas amácrinas y ganglionares al compararse con el CTL.
- (4) La aplicación intraperitoneal de azul de metileno previa a la inducción de AP, previene las variaciones en la actividad de NOS constitutiva, expresión y localización de nNOS observadas en la retina AP. Estos resultados sostienen la hipótesis que la aplicación de AM permite inhibir la cascada neurotóxica desencadenada al exacerbarse el sistema nitrérgico en la ROP.

## Discusión

Este trabajo demuestra que el AM es un potencial agente efectivo contra los efectos de la asfixia generados por acción del NO quien contribuye al desarrollo de RPI.

Previamente ha sido descrito que el NO, producto de la actividad enzimática de la NOS constitutiva, aumenta en la retina a partir de los 21 días de la lesión <sup>(12)</sup>. En este trabajo

se ha conseguido determinar que, mediante la aplicación de azul de metileno previamente a la inducción de AP, se bloquea la actividad de esta enzima inhibiendo la cascada neurotóxica dependiente del sistema nitrérgico.

Cuando se produce una lesión por hipoxia-isquemia en el SNC se desencadena en forma inmediata una cascada de eventos moleculares que conducen a la muerte celular por apoptosis o necrosis. El neurotransmisor excitatorio glutamato parece ser el principal responsable de la liberación masiva de NO, ya que al sobreactivar sus receptores NMDA y AMPA <sup>(9)</sup> genera un incremento del influjo de calcio a la célula y en consecuencia la liberación de NO por activación de la NOS. Además, la integridad de las membranas biológicas se ve afectada por la producción de ROS durante el proceso de reperusión que es capaz de activar otras enzimas, como lipasas, fosfolipasas, proteasas y quinasas.

Estos mecanismos han sido descritos en la retina isquémica, ya que la misma es parte del SNC <sup>(15,16,17,18)</sup>. El NO es generado en exceso en las neuronas amácrinas, horizontales, ganglionares, células de Müller y por el endotelio microvascular, es altamente tóxico formando ROS “per se” o reaccionando con otras ROS para formar el anión peroxinitrito <sup>(12)</sup>. Consistente con lo expuesto, se ha demostrado que la activación del factor de transcripción inducible por la hipoxia (HIF) activa, mediante su heterodímero Hif-1 $\alpha$  (citoplasmático) - Hif-1 $\beta$  (nuclear), la transcripción de numerosos genes entre los cuales se encuentran los que codifican para la NOS <sup>(18)</sup>.

Las capas más internas de la retina son las más lábiles a la escasez de oxígeno <sup>(18)</sup>. En esta región hemos localizado mayor expresión de nNOS en células amácrinas y ganglionares <sup>(12)</sup>, en las cuales no se observaron cambios con la aplicación de AM. En trabajos previos, también hemos observado protección mediante el uso de hipotermia, pero en este caso sería por medio de la disminución del metabolismo, y por lo tanto de todos los sistemas enzimáticos incluyendo la NOS <sup>(12)</sup>. Si bien tanto la hipotermia como el AM demuestran ser protectores, éste último agente actúa directamente sobre el sistema nitrérgico compitiendo con el NO por la unión del hierro en la guanidilato ciclasa soluble <sup>(33)</sup>, evitando el aumento de GMP cíclico y sus efectos negativos <sup>(34,35,36,37)</sup>.

El NO es un compuesto altamente liposoluble, lo cual facilita su difusión a través de las membranas celulares. Éste se comporta como un radical libre altamente reactivo por tener un electrón no apareado capaz de generar

peroxinitrito (ONCO-) en presencia de formas de oxígeno reactivo como el anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) que se produce por el estrés oxidativo en las membranas de las células hipóxicas <sup>(38)</sup>. Cuando el peroxinitrito reacciona con el hierro de ferroenzimas, desacopla la actividad de enzimas como la NOS afectando la cadena respiratoria mitocondrial. El estrés oxidativo que genera la hipoxia se ve modificado por la actividad antioxidante del AM compitiendo con el oxígeno por las oxidasas tisulares disminuyendo el daño oxidativo sobre la membrana celular.

Otras investigaciones que se han realizado para intentar disminuir el avance de la RPI <sup>(18,39,40)</sup> y de la ROP, con la aplicación de vitamina E <sup>(41)</sup>, D-penicilamina <sup>(42)</sup>, allopurinol <sup>(43)</sup>, reducción de la exposición a la luz <sup>(44)</sup> y suplementación de oxígeno <sup>(45)</sup> demostraron resultados poco alentadores. En este contexto, ahondar en las posibilidades terapéuticas del AM, podría contribuir en la lucha contra la ROP, principal causa de ceguera evitable en niños.

## Conclusión Final

El modelo de AP en rata resulta de gran utilidad para el estudio del desarrollo de RPI y de la fase II de la ROP. En este punto los resultados obtenidos afirman que en la retina hipóxico-isquémica, el NO cumple un rol importante en el desencadenamiento de eventos neurotóxicos, y que éstos son bloqueados con la aplicación de AM previo a la inducción de AP. Además, la aplicación de azul de metileno se postula como una nueva estrategia terapéutica la cual, validada como terapia, podría proporcionar una herramienta eficaz en la clínica, con la consiguiente prevención de daño neuronal provocado por la hipoxia-isquemia global.

## Agradecimientos

Al Prof. José Rodrigo, al Dr. Ricardo Matéiz Murillo y al Dr. Alfredo Matéiz, del Instituto Cajal, Madrid, España, por la donación de anticuerpos contra nNOS. A la Srta. Africa Sandonis Consuegra y al Sr. Etelvino Sánchez Pastor por su excelente colaboración técnica. Este trabajo ha sido subsidiado por la Universidad de Buenos Aires, Argentina, UBACyT 2010-2012 GC.

## Referencias

- 1- American Psychiatric Association (1987). *Diagnosis and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM III)*, Third Edition, Washington, DC. USA
- 2- Younkun D. (1992). Hypoxic-ischemic brain injury of the newborn-state-ment of the problem and overview. *Brain Pathology* 2: 209-210.
- 3- Rey-Funes M, Ibarra ME, Dorfman VB, López EM, López-Costa JJ, Coirini H, Loidl CF.(2010) Hypothermia prevents the development of ischemic proliferative retinopathy induced by severe perinatal asphyxia. *Exp Eye Res.* 2010 Jan;90(1):113-20. Epub 2009 Sep 26
- 4- Rey Funes M, Capani F, López E.M., López-Costa J.J., Pelayes D, Zarate J., Loidl C.F., Coirini H. (2003) Retinopathy of prematurity in a model of perinatal asphyxia: effects of cold treatment. *Society for Neuroscience*. New Orleans, november 8-12.
- 5- Palmer E.A., Flynn J.T., Hardy R.J., Phelps D.L. (1991) The Cryotherapy for Retinopathy of Prematurity Cooperative Group. Incidence and early course of retinopathy of prematurity. *Ophthalmology* 98:1628-1640.
- 6- Wright K., Anderson M.E., Walker E., Lorch V. (1998) Should Fewer Premature Infants Be Screened for ROP. *Pediatric* vol 102 N°1: 31-35.
- 7- Gilbert C.I. (2001) Childhood Blindness in the context of VISION 2020-the right to sight. *Bull WHO Org.*;79(3):227-232.
- 8- Farooqui A, Haun S and Horrocks L (1994) Ischemia and Hypoxia. In *Basic Neurochemistry*, 5th Ed, edited by Siegel G. Raven Press, Ltd, NY, USA.
- 9- Farooqui L, Farooqui AA, (1991). Excitatory aminoacid receptors, neural membrane phospholipid metabolism and neurological disorders. *Brain Res Rev.* 16: 171-191.
- 10 -Bredt D, Hwang P, Snyder S. (1990) Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature* 347: 768-770.
- 11- Moncada S and Higgs A (1993) The L-arginine-nitric oxide pathway. *New Engl. J. Med.* 329: 2002-2012.
- 12- Rey-Funes M, Ibarra ME, Dorfman VB, Serrano J, Fernández AP, Martínez-Murillo R, Martínez A, Coirini H, Rodrigo J, Loidl CF. (2011) Hypothermia prevents nitric oxide system changes in retina induced by severe perinatal asphyxia. *J Neurosci Res.* 2011 May;89(5):729-43. doi: 10.1002/jnr.22556. Epub 2011 Feb 17
- 13- Beckman J.S., Beckman T.W., Chen J., Marshall P.A., Freeman B.A. (1990) Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 1620-1624.
- 14- Dawson, V.L., Dawson, T.M., London, D.B., Bredt, D.S., Snyder, S.H. (1991). Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cordical cultures. *Proc Natl Acad Sci USA.* 88: 6368-6371.
- 15- Szabo ME, Droy Lefaix MT, Doly M, Braquet P. (1992). Ischaemia and reperfusion induced Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> shifts in rat retina: effects of two free radical scavengers SOD and EGB 761. *Exp. Eye Res.* 55: 39-45.
- 16-Goldstein IM, Ostwald P, Roth S. (1996) Nitric oxide: a review of its role in retinal function and disease. *Vision Res.* 36: 2979-2994.
- 17- Sennlaub F, Courtois Y (2001). Inducible nitric oxide synthase mediates retinal apoptosis in ischemic proliferative retinopathy. *Journal of Neuroscience* 22 (10); 3987-3993.
- 18- Osborne N, Casson R, Chidlow G, Graham M, Melena J. (2004). Retinal ischemia: mechanism of damage and potential therapeutic strategies. *Retinal Eye Res.* 23: 91-147.
- 19- Wright RO, Lewander WJ, Woolf AD. (1999) Methemoglobinemia: etiology, pharmacology, and clinical management. *Ann Emerg Med*; 34:646-56.
- 20- Metz EN, Balcerzak SP, Sagone AL Jr. Mechanisms of methylene blue stimulation of the hexose monophosphate shunt in erythrocytes. *J Clin Invest* 1976; 58: 797-802.
- 21- McCord JM, Fridovich I. The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. II. The mechanism of mediation of cytochrome c reduction by variety of electron carriers. *J Biol Chem* 1970; 245: 1374-1377.
- 22- Heydrick SJ, Reed KL, Cohen PA, Aarons CB, Gower AC, Becker JM, Stucchi AF. (2007) Intraperitoneal administration of methylene blue attenuates oxidative stress, increases peritoneal fibrinolysis, and inhibits intraabdominal adhesion formation. *J Surg Res. Dec*;143(2):311-9. Epub 2007 Sep 10.
- 23- Salaris SC, Babbs CF, Vorhees WD. (1991) Methylene blue as an inhibitor of superoxide generation by xanthine oxidase. *Biochem Pharmacol*; 42:171-174.
- 24- Aksu B, Umit H, Kanter M, Guzel A, Aktas C, Civelek S, Uzun H. (2010) Effects of methylene blue in reducing cholestatic oxidative stress and hepatic damage after bile-duct ligation in rats. *Acta Histochem.* May;112(3):259-69.
- 25- Peter C, Hongwan D, Kupfer A, Lauterburg BH. (2000) Pharmacokinetics and organ distribution of intravenous and oral methylene blue. *Eur J Clin Pharmacol*; 56:247-50.
- 26- Sternberger L.A.S. (1986). *Immunohistochemistry*, 3<sup>a</sup> edition, John Wiley, New York.
- 27- Uttenthal LO, Alonso D, Fernandez AP, Campbell RO, Moro MA, Leza JC, Lizasoain I, Esteban FJ, Barroso JB, Valderrama R, Pedrosa JA, Peinado MA, Serrano J, Richart A, Bentura ML, Santacana M, Martínez-Murillo R, Rodrigo J. (1998) Neuronal and inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine immunoreactivities in the cerebral cortex of the aging rat. *Microsc Res Tech.* 1;43(1):75-88
- 28- Pearse AG.(1964) The solitary active cells. Histochemical demonstration of damage-resistant nerve cells with a TPN-Diaphorase reaction. *Acta Neuropathol.* Jan 2;3:238-49.
- 29- Vincent SR, Kimura H. (1992) Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neuroscience* ;46(4):755-84.
- 30- Rey-Funes M. (2005) "Alteraciones moleculares y celulares en la retina de ratas sometidas a asfisia perinatal" Tesis de Maestría en Biología Molecular Médica, Universidad de Buenos Aires.
- 31- Radomski MW, Vallance PJ, Moncada S (1993) Modulation of platelet adhesion to human vascular endothelium by the constitutive and cytokine-inducible nitric oxide synthases. *Cardiovas Res* 27: 1380-1382.
- 32- Rodrigo J, Alonso D, Fernández AP, Serrano J, Richart A, López J.C., Santacana M, Martínez-Murillo R, Ventura M.L., Ghiglione M., Uttenthal L.O.(2001) Neuronal and inducible nitric oxide synthase expression and protein nitration in rat cerebellum after oxygen and glucose deprivation. *Brain Res.* 909: 20-45.
- 33- Mayer B, Brunner F, Schmidt K. (1994) Novel actions of methylene blue. *Eur Heart J.* 14(Suppl.):22-26.
- 34- Yiu P, Robin J, Pattison CW. (1999) Reversal of refractory hypotension with single dose methylene blue after coronary artery bypass surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 118:194-195.
- 35- Argenziano M, Chen JM, Choudhri AF, Cullinane S, Garfein E, Weinberg AD, Smith CR Jr, Rose EA, Landry DW, Oz MC. (1998) Management of vasodilatory shock after cardiac surgery: identification of predisposing factors and use of a novel pressor agent. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 116(6):973-980.
- 36- Marczin N, Ryan US, Catravas JD. (1992) Methylene blue inhibits nitrovasodilator- and endothelium-derived relaxing factor-induced cyclic GMP accumulation in cultured pulmonary arterial smooth muscle cells via generation of superoxide anion. *J Pharmacol Exp Ther*;263:170-9.
- 37- Gruetter CA, Kadowitz PJ, Ignarro LJ. (1981) Methylene blue inhibits coronary arterial relaxation and guanylate cyclase activation by nitroglycerin, sodium nitrite, and amyl nitrite. *Can J Physiol Pharmacol*;59:150-6.
- 38- Ignarro L, Murad F, (1995) Nitric oxide: biochemistry, molecular biology, and therapeutic implications. *Advances in Pharmacology*, Vol. 34. Academic Press
- 39- Wilkinson-Berka JL, Alousis NS, Kelly DJ, Gilbert RE (2003) COX-2 inhibition and retinal angiogenesis in a mouse model of retinopathy of prematurity. *Invest Ophthalmol Vis Sci*;44(3):974-9
- 40- Porta M, Allione A. (2004) Current approaches and perspectives in the medical treatment of diabetic retinopathy. *Pharmacol Ther*;103 (2):167-177.
- 41- Raju TN, Langenberg P, Bhutani V, Quinn G (1997) Vitamin E prophylaxis to reduce ROP: a reappraisal of published trials. *J Pediatrics* 131 (6):844-850
- 42- Phelps DL, Lakatos L, Watts JL.(2000). D-Penicillamine for preventing retinopathy in preterm infants. *The Cochrane library*.
- 43- Russell GA, Cooke RW. (1995) Randomised controlled trial of allopurinol prophylaxis in very preterm infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.*;73(1):F27-31.
- 44- Phelps DL, Watts JL (1997). Early light reduction to prevent retinopathy of prematurity in very low birth weight infants. In *The Cochrane Library*, Issue 1 Oxford.
- 45- STOP ROP Multicenter Trial (2000). Supplemental therapeutic oxygen for retinopathy of prematurity (STOP-ROP), a randomized, controlled trial. I: primary outcomes. *Pediatrics*; 105(2):295-310.