

Hacia un Modelo Experimental de ROP: Estudio Estructural y Ultraestructural

Rey-Funes, Manuel

Ibarra, Mariano E.

Coirini, Héctor

Larrea, Pablo

Loidl, C. Fabián

Laboratorio de Neuropatología Experimental, Instituto de Biología Celular y Neurociencias
Prof. De Robertis, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

Correspondencia:

Rey Funes, Manuel

"Laboratorio de Neuropatología experimental"

Instituto de Biología Celular y Neurociencias "Prof. Eduardo De Robertis";

Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

Paraguay 2155 3° Piso

Tel: 5950-9500 int. 2078

E-mail: manureyfunes@mixmail.com

RESUMEN

Objetivos: Las complicaciones obstétricas y entre ellas la asfisia perinatal (AP), son causa de lesiones retinianas, como la retinopatía proliferativa isquémica, que incluye a la retinopatía del prematuro (ROP). Hasta hoy no existen modelos para estudiar esta afección.

Métodos: Se presenta un modelo de AP experimental, con el que se han podido estudiar alteraciones estructurales y ultraestructurales en la retina.

Resultados: Hemos observado el desarrollo de una membrana neovascular epirretinal, signos de neurodegeneración, vasos de neoformación y reacción astrogliar. Estas alteraciones son compatibles con las descripciones histopatológicas de ROP.

Conclusiones: El modelo de AP es útil para estudiar experimentalmente la ROP. La aplicación de hipotermia tiene un potente efecto protector sobre las alteraciones descritas. Esto permitiría el desarrollo de terapias que eviten o atenúen el daño en la retina, aportando mejoría en la calidad de vida y disminuyendo el costo médico, familiar y social en patologías de ceguera evitables.

Palabras claves: retina, asfisia perinatal, retinopatía del prematuro, hipotermia.

ABSTRACT

Objective: Obstetric complications, perinatal asphyxia (PA) included, are cause of retinal injuries as retinopathy of prematurity (ROP), a type of ischemic proliferative retinopathy. Up to date there are not experimental models for studying this disease.

Methods: We present a model of experimental PA which shows structural and ultrastructural retinal alterations.

Results: We observed the pathologic development of neovascular epirretinal membrane, neurodegeneration, vessels of neof ormation and astroglial reaction. These alterations are compatible with the histopathological description of ROP.

Conclusions: This model of PA is useful for studying the ROP at experimental level. The application of hypothermia has a potent protective effect in the described alterations. This study could contribute in the development of therapies in order to ameliorate or avoid the retinal damage. In this manner, hypothermia could improve life quality and decrease medical, familiar and social costs for evitable causes of blindness.

Key words: retina, perinatal asphyxia, retinopathy of prematurity, hypothermia.

Introducción

La asf ixia perinatal (AP) es el problema más serio a nivel mundial en Perinatología. Cada año, cuatro millones de recién nacidos sufren AP. Según numerosas estadísticas clínicas, una tercera parte fallece y otro tercio no padecerá consecuencias, mientras que el tercio restante sufrirá daños neurológicos, entre los cuales se incluyen diferentes grados de retinopatía isquémica (Hill¹ 1991, Younkin² 1992). La gravedad sufrida durante el parto no se relaciona con un pronóstico de morbo-mortalidad, y es así como casos de AP graves pueden no desarrollar lesiones neurológicas y casos leves pueden terminar en espasticidad o muerte. Todo parece indicar que la susceptibilidad individual es el factor más importante en cuanto al desarrollo de lesión en el sistema nervioso central (SNC). En países subdesarrollados, la AP es un problema aún más grave, debido a que las precauciones, o los cuidados necesarios, no son considerados o aplicados en forma adecuada (Costello³, 1994).

El crecimiento normal y la homeostasis de un feto dependen de su adecuado intercambio de gases, nutrientes y productos metabólicos con la placenta. Si estos mecanismos fallan, se establece una insuficiencia en los requerimien-

tos fetales, especialmente del oxígeno, llevando a un estado de asf ixia aguda o crónica. En el 90% de los casos esta asf ixia se produce durante el período ante-parto (compresión de cordón umbilical, malas maniobras obstétricas, placenta previa, desprendimiento de placenta, envejecimiento placentario, hemorragia y/o anemia materna, toxemia gravídica, infarto placentario, etc.), denominándose a este estado como asf ixia perinatal (AP).

La AP se encuentra entre aquellas afecciones que inducen una hipoxia-isquemia global en el SNC. El grado de severidad y el tiempo en que se mantiene el arresto de oxígeno serán determinantes en el desarrollo de las consecuencias de esta afección. La mayoría de los infantes mueren en el período perinatal y el 20-30% de los sobrevivientes presentarán secuelas que se harán evidentes a corto o largo plazo entre las que se destacan: el Síndrome de Déficit de Atención e Hiperactividad (DSM-III, American Psychiatric Association⁴, 1987), epilepsias, retardo mental, la parálisis cerebral o espasticidad; y alteraciones auditivas y visuales (Younkin, 1992).

Entre los mecanismos involucrados en el daño neuronal por hipoxia-isquemia los más

importantes incluyen a la liberación de aminoácidos excitatorios (Choi⁵, 1987, Loidl⁶, 1993), la generación de radicales libres (Capani⁷⁻⁸, 2001, 2003), la liberación de óxido nítrico (NO) y otros neurotransmisores, la acumulación de ácido láctico, el masivo ingreso de calcio, la degradación de los fosfolípidos de membranas y lipoperoxidación (Farooqui⁹, 1994) y las alteraciones en el citoesqueleto axonal (neurofilamentos) (Cebral¹⁰, 2006).

La retina es un órgano particularmente sensible al déficit de oxígeno, y aún más sus capas internas (nuclear interna, plexiforme interna, de células ganglionares, fibras del nervio óptico y limitante interna). Si bien numerosas hipótesis se han postulado acerca de esta sensibilidad diferencial en respuesta a la noxa hipóxica, ninguna ha sido aún plenamente confirmada (Osborne¹¹, 2004).

La AP puede desarrollar en casos severos, diferentes grados de retinopatías, pudiendo llevar a la ceguera. La histopatología que se ha observado y descrito en nuestro laboratorio (Rey-Funes¹², 2003), utilizando un modelo experimental de AP en la rata, es compatible con la descripción de retinopatía proliferativa isquémica (RPI), que se observa en diferentes afecciones tales como diabetes mellitus, oclusión de venas retinales y retinopatía del prematuro (ROP). La RPI se caracteriza por presentar neovascularización e hipertrofia glial de las células de Müller en las capas más internas de la retina (zona epirretinal). La ROP es la causa evitable más frecuente de ceguera en los niños (Palmer¹³, 1991) y en países con tasas de mortalidad infantil de entre 1 y 6 %, esta afección está ahora emergiendo como la mayor causa de la ceguera infantil (Wright¹⁴, 1998; Gilbert¹⁵, 2001).

Los niños con riesgo de desarrollar ROP son aquellos prematuros de bajo peso colocados en incubadoras en condiciones de hiperoxia y los que reciben oxigenoterapia. En el prematuro menor de 32 semanas, la estructura vascular de la coroides se completa en períodos tempranos de la vida fetal y es el soporte circulatorio de las capas sensitivas de la retina. Este tejido corioideo es altamente vascularizado, y es conocido que carece de la capacidad de autorregular el aporte de oxígeno en casos de mayor flujo sanguíneo o aumento de la PaO₂ (Hardy¹⁶, 2000), por lo cual la hiperoxia de las incubadoras, a la que son expuestos los neonatos prematuros, resulta tóxica. Esto

es particularmente nocivo para los tejidos del neonato inmaduro, que no tiene completamente desarrolladas sus defensas antioxidantes, como los sistemas enzimáticos superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa. (Jancov¹⁷, 2001)

El desarrollo de la ROP consta de dos fases. La primera, se caracteriza por una lesión de tipo oxidativa que daña el endotelio y oblitera los vasos en formación, resultando en un área avascular y periférica observable en la retina. El bajo metabolismo en esta última zona, es la responsable de inducir la segunda fase, desencadenando una reactivación de la vascularización, lo que resulta en una neovascularización debida a la liberación de factores angiogénicos y de crecimiento celular y vascular como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Hardy, 2000; Jancov¹⁷, 2001; Smith¹⁸, 2003).

Evidentemente el tratamiento más efectivo para las afecciones producidas por la asfisia perinatal sería la prevención. Sin embargo, dadas las causas que la provocan, es imprescindible la evaluación de otras estrategias terapéuticas preventivas del daño neurológico y oftalmológico a corto y largo plazo.

A partir de estudios previos en el laboratorio, la disminución de la temperatura de 37°C hasta 15°C resulta en un significativo aumento en la sobrevivencia en animales experimentales sometidos a AP. Cuando la AP se induce a baja temperatura (15°C), casi el 100% de la camada experimental sobrevive más allá de los 100 minutos de asfisia (Loidl¹⁹, 1993; 1997; 1998). Además la hipotermia durante la AP tiene un efecto preventivo de las consecuencias de la AP a largo plazo. Este hallazgo concuerda con los estudios experimentales que demuestran que las bajas temperaturas protegen las neuronas que fueron sometidas a isquemia cerebral transitoria. El efecto protector estaría relacionado en un principio con la reducción de las demandas energéticas cerebrales y el consecuente ahorro en el consumo de ATP (Young²¹, 1983). También, el tratamiento hipotérmico retrasaría la instalación de una acidosis extracelular por acumulación de lactato, el cual fue propuesto como neurotóxico (Nedegaard²², 1991).

Históricamente, se han realizado algunas aplicaciones clínicas combinando hipotermia y presión positiva de oxígeno en recién naci-

dos asfícticos que prometieron ser muy exitosas (Westin²³, 1971). Estudios con neonatos asfícticos que fueron inmediatamente colocados en agua a una temperatura de 8 a 14°C hasta que presentaron respiración espontánea no asistida, fueron controlados durante 3 años evaluando su desarrollo; el cual resultó ser normal y sin presentar episodios convulsivos (Dunn y Miller²⁴, 1969). No queda claro por qué estos estudios no han tenido mayor resonancia médica clínica siendo que la muerte post-asfíxia es cercana al 50%. Quizás una de las causas por las que no se practica este tipo de tratamiento sea por el temor de incrementar los índices de morbimortalidad. Aunque no hay controversias en cuanto a que una larga exposición al frío es perjudicial, no existen evidencias de que una disminución de la temperatura corporal lo sea, cuando se aplica en forma transitoria, inmediatamente después del nacimiento o durante la asfíxia. Este tipo de estudios fueron prácticamente olvidados hasta que a principios de los años 80 la hipotermia vuelve a tomar vigencia como agente neuroprotector en el infarto cerebral (Globus²⁵⁻²⁶, 1987 y 1989).

En experimentos previos del laboratorio, se ha observado que la AP a 37°C (en condiciones de normotermia) presenta una mortalidad del 100% luego de 22 minutos de asfíxia. Sin embargo, a 15°C el 100% de los animales sobrevive. Por lo tanto la mortalidad producida por AP (a 37°C) puede ser disminuida al cambiar la temperatura durante la asfíxia. Otras observaciones indicaron que se puede disminuir la mortalidad, cuando el cambio de temperatura de 37°C a 15°C se realice antes de los 15 minutos de exposición asfíctica. Luego de este período de tiempo, la reducción de temperatura no previene la mortalidad. Estos experimentos demuestran la importancia que tiene la temperatura en que se produce la asfíxia y la capacidad preventiva de la hipotermia (Loidl, 1997).

Se presenta en este trabajo un estudio estructural y ultraestructural de la retina de animales sometidos a un modelo experimental de AP. Se evaluó la potencial utilidad de este modelo para estudiar la ROP, así como el efecto terapéutico de la aplicación de hipotermia.

Materiales y métodos

Modelo de desarrollo de ROP por asfíxia perinatal (AP):

Animales

En todos los casos se utilizaron ratas de la cepa Sprague-Dawley, con calidad genética y sanitaria certificada en el bioterio del Instituto de Biología y Medicina Experimental, siguiendo las normas internacionales de FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Associations).

Todos los procedimientos relacionados con el manejo y tratamiento de los animales fue realizado de acuerdo con la guía de cuidados para animales de laboratorio (revisada en 1996) de los Institutos Nacionales de la Salud de los Estados Unidos de América (National Institute of Health *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* - Publications No. 80-23).

Inducción de la asfíxia

Se utilizaron ratas preñadas (n = 52) en el último día de gestación (22-23 días). Las mismas fueron anestesiadas con hidrato de cloral 28% P/V (0.1 ml/100g/peso); y rápidamente histerec-tomizadas. Posteriormente, los fetos aún contenidos dentro del útero extirpado, se sumergieron durante 20 minutos en: agua a 37°C (asfíxia perinatal severa en normotermia, AP) o agua a 15°C (AP en hipotermia, HIP). Inmediatamente luego de la AP, los fetos fueron extraídos del útero, secados de sus fluidos y estimulados manualmente a respirar, siendo un signo importante de su recuperación el boqueo o "gasping".

Se procedió entonces a ligar el cordón umbilical, y se observó a los animales durante los 40-80 minutos posteriores al alumbramiento manual. Los sobrevivientes fueron colocados con una rata madre sustituta, que tuvo cría normalmente el mismo día, reemplazando parte de sus recién nacidos por los experimentales asfícticos previamente identificados. Se consideraron animales experimentales únicamente aquellos que cumplieron con los siguientes parámetros: 1) longitud occipitocaudal > 41 mm; (2) peso > 5 g.

En experimentos previos (Loidl, 1998) ha sido determinado que el porcentaje de sobrevida de los animales depende del tiempo y de la tempe-

ratura en que se induce la AP. A 37°C hay un 100% de sobrevida hasta 15 min., 20% de sobrevida a los 20 minutos y 0% de sobrevida más allá de los 22 min. En cambio, en condiciones de hipotermia a 15°C, la sobrevida se extiende dramáticamente hasta un 100% a los 100 minutos, siendo 0% más allá de los 145 min. Además, ha sido observado que las ratas hembras presentan una sobrevida significativamente mayor que los machos sometidos a AP en condiciones de normotermia.

En el presente estudio se utilizaron solamente ratas macho para evitar la influencia de los estrógenos, generándose los siguientes grupos experimentales: a) Controles nacidos por cesárea (CTL), b) AP durante 20 minutos a 37°C (AP) y c) AP durante 20 minutos a 15°C (HIP).

El modelo animal utilizado ha sido aprobado por los Comités de Ética del Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME), Buenos Aires, Argentina; del Karolinska Institutet, Estocolmo, Suecia y del Akademisch Ziekenhuis Maastricht (AZM), Maastricht, Países Bajos.

Obtención del tejido

Cuando los animales sometidos a AP, en condiciones de normotermia e hipotermia, y sus controles cumplieron los 60 días de edad, estos fueron anestesiados con hidrato de cloral 28% P/V (0.1ml/100g/peso) por vía intraperitoneal, enucleados y sacrificados. 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.)

Técnica de Hematoxilina-Eosina (H-E)

Los tejidos fueron deshidratados en alcoholes de graduación creciente, aclarados en xilol e incluidos en parafina. Los tacos de parafina resultantes fueron cortados con un micrótopo de tipo Minot y las secciones, de un espesor de aproximadamente 5-10 µm, se montaron en portaobjetos. Los tejidos fueron luego nuevamente rehidrata-

dos y teñidos con los colorantes H-E. Finalmente, los preparados fueron montados con resinas sintéticas (Depex), observados al microscopio óptico (M.O.) y fotografiados para su análisis.

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 1,5% y se procesaron para las siguientes técnicas:

Inmunohistoquímica: Técnica de Peroxidasa-anti-peroxidasa (PAP)

Detalles de esta técnica se pueden encontrar en Sternberger & Sternberger's PAP²⁷, 1986.

Se utilizaron los siguientes anticuerpos (Ac) primarios:

a) Ac anti-GFAP (proteína gliofibrilar ácida), anticuerpo policlonal de conejo en una dilución de 1:3000. El aumento en la expresión de estos filamentos intermedios indica respuesta astrogliar a lesiones en el SNC (por ej. a la lesión hipóxica-isquémica).

b) Ac anti-CD31, anticuerpo de la cepa MEC 13.3 rata α ratón CD31, en una dilución 1:2; suministrado por el Laboratorio de la Prof. Dra. Waistock y del Prof. Dr. Mordoh, Fundación Le-loir, Buenos Aires. Esta proteína es un marcador endotelial.

Cortes semifinos para M.O.y M.E.

Para ésta técnica, las retinas obtenidas fueron fijadas por inmersión en una solución de paraformaldehído al 4% + glutaraldehído al 0.25% durante 4 horas. Luego, los polos posteriores se lavaron, se post-fijaron en tetróxido de osmio y se deshidrataron en alcoholes de graduaciones crecientes y óxido de propileno. Por último, fueron incluidos en Durcupán.

Se realizaron cortes de 1µm de espesor con un ultramicrotomo Reichert y se tiñeron con el colorante Azul de Toluidina. Las grillas con el material cortado para ME fueron observadas en un ME de transmisión Zeiss.

Análisis de imágenes y estadístico

Mediante un programa de análisis por imágenes computarizado (ScionImage) se midió el espesor de la epirretina en los diferentes grupos.

Las determinaciones obtenidas fueron evaluadas por análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguidos de test de Fisher. Las diferencias fueron consideradas significativas cuando el valor de p fue menor de 0,05.

Resultados

Estudios estructurales

Hematoxilina-Eosina (H-E)

En las secciones de retina de los animales del grupo AP se observó un claro desarrollo de neovascularización en la zona más interna de la retina al ser comparados con el grupo CTL (Fig.1)

Las imágenes son compatibles con las descripciones histopatológicas realizadas en humanos, denominada membrana neovascular epirretinal (Schulenburg y Tsanaksidis²⁸, 2004). En los animales HIP no se observó esta neoformación de vasos y además, el grosor de la membrana epirretinal fue menor en relación con la de los animales asfícticos (Fig. 1).

El análisis de las imágenes registró un aumento significativo en el espesor de las capas internas de la retina (ganglionar, fibras del nervio óptico y capa limitante interna -epirretinal-) de aproximadamente tres veces en las retinas asfícticas con respecto a CTL. El grupo HIP no mostró cambios significativos. (Gráfico 1)

Tinción con Azul de Toluidina

En las imágenes obtenidas mediante esta técnica, se observó que las retinas de los animales del grupo AP presentan un engrosamiento de las capas retinianas más internas (capas de neuronas ganglionares, de fibras del nervio óptico y limitante interna -epirretina-) y vasos de neoformación, los cuales no están presentes en las retinas de animales del grupo CTL (Fig. 2); concordando con los resultados obtenidos con H-E. Además, en la fotografía que corresponde a los animales AP, se destaca la presencia de núcleos de neuronas con morfología alterada y con diferentes grados de condensación de la cromatina el cual es

signo de degeneración neuronal. Estos cambios se observaron tanto en neuronas ganglionares como en neuronas de la capa nuclear interna y fotorreceptores de la capa nuclear externa.

Estos cambios significativos estructurales y celulares no se evidenciaron en los animales del grupo HIP.

Inmunohistoquímica con anticuerpos contra la proteína gliofibrilar ácida (GFAP)

En las retinas de los animales del grupo AP se observó, un aumento de la inmunorreactividad para GFAP en las capas de fibras del nervio óptico y limitante interna respecto a las secciones del grupo CTL. En esta zona se expanden los procesos astrogliales de las células de Müller inmunomarcadas, cuyas prolongaciones internas se muestran hipertrofiadas, produciendo un engrosamiento denominado membrana fibrosa epirretinal, que está en concordancia con la membrana neovascular epirretinal evidenciada con la técnica de H-E. En las secciones de retinas de los animales HIP el grosor de la zona epirretinal fue similar a lo que se evidenció en los animales del grupo CTL (Fig. 1).

Inmunohistoquímica con anticuerpos contra el receptor proteico "Cluster Differentiation 31" ó CD31

En las retinas de animales del grupo AP se evidenció un gran aumento de la inmunorreactividad para CD31 en las capas de células ganglionares, de fibras del nervio óptico y limitante interna (epirretina), y de esta manera, se comprobó una clara neoformación de vasos, reafirmando la observación de una membrana neovascular epirretinal con H-E, arriba descrita. También se observó una mayor inmunorreactividad en la vasculatura de la capa plexiforme externa (Fig. 1). En los animales del grupo HIP la inmunorreactividad para CD31 fue similar a lo evidenciado en los animales CTL.

Estudios ultraestructurales

La microscopía electrónica confirmó los hallazgos observados en la óptica. Los procesos internos de las células de Müller se encuentran hipertrofiados, lo cual resulta consistente con el aumento de la expresión de GFAP. Además otra

característica típica del RPI como la neovascularización se puede corroborar con la microscopía electrónica. Finalmente, se evidencian neuronas ganglionares en proceso de clara degeneración en el grupo AP. La hipotermia revierte estas alteraciones mostrando características ultraestructurales similares a los controles (Fig.2).

Discusión

Los principales hallazgos de este trabajo son: que el modelo de asfixia perinatal utilizado reproduce los cambios anatomopatológicos descritos para RPI confirmados tanto por microscopía óptica como por electrónica, lo cual lo hace un modelo válido para el estudio de estas patologías; que como se trabaja con ratas que son equivalentes evolutivamente a la gesta de un humano de 32 semanas, este modelo es útil para estudiar la Fase Proliferativa de la ROP y posibles estrategias terapéuticas y que la hipotermia durante el proceso de asfixia, previene las alteraciones que produce la AP.

Se han desarrollado varios modelos para estudiar los efectos de la AP, pero la mayoría de ellos tienen el problema de ser invasivos (por ejemplo, ligadura carotídea), por lo cual deben realizarse en animales de una o más semanas y ser inmediatamente sacrificados para su estudio (Raju²⁹, 1992).

Nosotros hemos trabajado en el desarrollo de un modelo experimental no invasivo (Loidl, 1993,1997) para los tejidos del animal, que produce una hipoxia-isquemia global del organismo y por lo tanto del SNC. En este modelo la AP se induce en el preciso momento del nacimiento, simulando situaciones patológicas o de malas maniobras que se producen durante el parto. El logro principal de este modelo ha sido ofrecer por primera vez, la posibilidad de estudiar los efectos de la AP a largo plazo, ya que los recién nacidos se dejan al cuidado fisiológico de madres sustitutas, por lo que se desarrollan normalmente, facilitándose de esta manera su estudio a largo plazo.

Como se ha explicado arriba, la AP induce lesiones en el SNC y la retina es unas de las áreas afectadas desarrollando una retinopatía. En la

histopatología, la RPI presenta como signos patognomónicos la presencia de membrana epirretinal fibrosa y/o neovascular (Schulenburg y Tsanaksidis, 2004). Los estudios histopatológicos realizados en este modelo experimental son consistentes con los cambios descritos en la patología de la RPI. Además, nosotros confirmamos estos cambios con el análisis al microscopio electrónico. Por otro lado, este modelo ofrece la posibilidad de estudiar las alteraciones en prematuros ya que las ratas nacidas a término son equivalentes a 28 a 32 semanas de desarrollo evolutivo en el humano (Palmer y Vanucci³⁰, 1993). Si a esto le sumamos los desbalances homeostáticos que sufren los neonatos en el manejo de la presión de oxígeno y flujo sanguíneo, este modelo permitiría estudiar los mecanismos fisiopatológicos que se desencadenan en la fase 2 de la ROP, así como también evaluar posibles estrategias terapéuticas para disminución del daño de la retina.

Muchas investigaciones se han realizado para intentar disminuir el avance de la RPI (Osborne, 2004; Wilkinson-Berka³¹, 2004; Porta y Allione³², 2004) y de la ROP. Entre los agentes terapéuticos utilizados podemos citar: antioxidantes como vitamina E (Raju³³, 1997), D-penicilamina (Phelps³⁴, 2000), allopurinol (Russell³⁵, 1995), reducción de la exposición a la luz (Phelps³⁶, 1997) y suplementación de oxígeno (Stop ROP³⁷, estudio multicéntrico, 2000). Lamentablemente en general los resultados son poco alentadores.

Por otro lado, la administración de corticoides en forma precoz a niños pretérmino, para prevenir enfermedad pulmonar crónica y la suplementación con inositol para disminuir el Síndrome de Distress Respiratorio, han demostrado como resultado secundario una disminución en la severidad de ROP (Howlett³⁸, 2003). Sin embargo, estos avances terapéuticos distan de ser un tratamiento altamente efectivo. También se ha propuesto como terapia eficaz en la disminución del grado de neovascularización retinal, a la indometacina (Nandgaonkar³⁹, 1999), dexametasona (Rotschild⁴⁰, 1999), rofecoxib (Wilkinson-Berka⁴¹, 2003) y bucillamina (antiinflamatorio similar a D-penicilamina).

Utilizando nuestro modelo experimental, hemos observado que la disminución en la temperatura resulta en un significativo aumen-

to en la sobrevida de los animales sometidos a AP, produciendo además un efecto protector de las alteraciones que presentan los animales AP a largo plazo. En el presente estudio se han extendido estas observaciones a la retina. Este efecto protector estaría relacionado con una reducción en las demandas energéticas (Young, 1983; Nedegaard, 1991). La inducción de AP en condiciones de hipotermia previene la formación de una astrocitosis reactiva y la neovascularización epirretinal. Por lo tanto, la hipotermia promete ser un arma terapéutica eficaz en la prevención de la ROP.

En conclusión, el modelo de AP en rata sería de utilidad para el estudio del desarrollo de RPI y de la fase II de la ROP, ya que si bien es difícil evaluar si las consecuencias clínicas son similares al humano, los cambios estructurales y ultraestructurales que aparecen son coincidentes con los actuales reportes histopatológicos de dicha afección. Por lo tanto, este modelo de AP sería de utilidad para el estudio de estas patologías, y podría aportar valiosa información sobre los mecanismos fisiopatológicos que se desencadenan.

Este modelo experimental permitiría el estudio de posibles estrategias terapéuticas. El tratamiento hipotérmico dentro de una ventana temporal luego de producida la asfixia, podría ser igualmente efectivo a lo observado y expuesto en este trabajo en el grupo hipotérmico. La validación de esta terapia proporcionaría a la clínica una herramienta eficaz y de fácil aplicación para prevenir los daños neuronales y la angiogénesis provocados por la hipoxia-isquemia global en la retina.

Figura 1: En la fila superior se observan secciones de retina teñidas con hematoxilina-eosina que demuestran un aumento en el espesor de la epirretina (EP) en el grupo asfíctico (AP) con respecto al control (CTL) e hipotérmico (HIP). La flecha señala un vaso de neoformación.

La fila media corresponde a secciones de retina inmunoteñidas para CD31. El grupo AP presenta un aumento de la inmunomarcación en la región epirretinal (flecha) con respecto a CTL e HIP.

La fila inferior corresponde a secciones de retinas inmunomarcadas para GFAP. Es notorio el aumento de la marcación en la epirretina de animales AP (flecha) con respecto a CTL e HIP. La cabeza de flecha muestra un proceso interno de una célula de Müller que se encuentra hipertrofiado y varicosado.

Referencias: EP (epirretina), PI (capa plexiforme interna), NI (capa nuclear interna). Barra=100µm

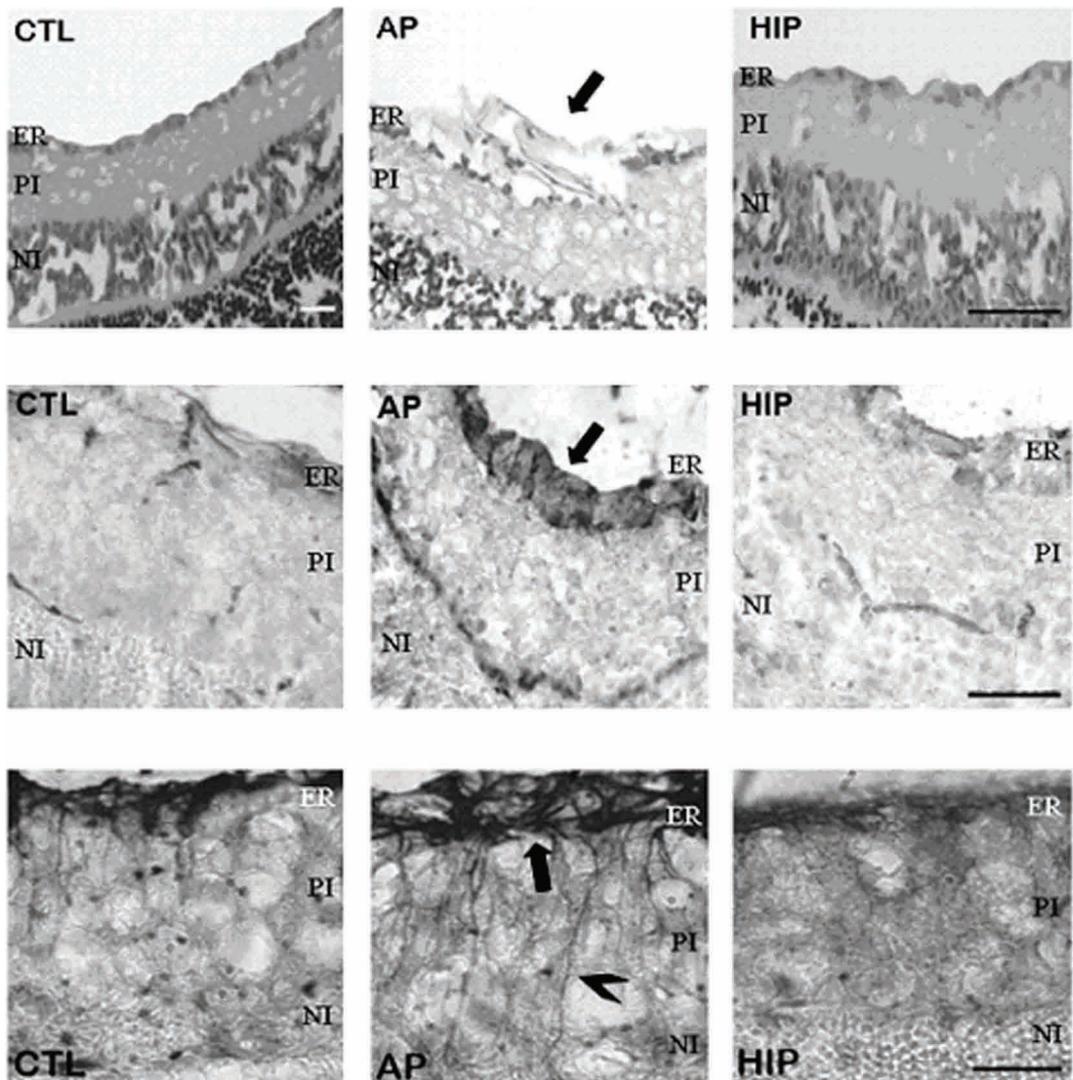


Figura 2: En la columna de la izquierda se observan secciones de retina teñidas con técnica de Nissl. En el grupo AP se observa un engrosamiento de la epirretina (EP) y núcleos neuronales degenerados en las capas ganglionar y nuclear interna (NI) con respecto al control (CTL). Estos cambios no se observaron en HIP. Barra=30µm
En la columna de la derecha se observan microfotografías electrónicas correspondientes a núcleos de neuronas ganglionares del grupo AP, en claro proceso degenerativo. CTL e HIP no mostraron cambios.
Referencias: EP (epirretina), PI (capa plexiforme interna), NI (capa nuclear interna), NE (nuclear externa).

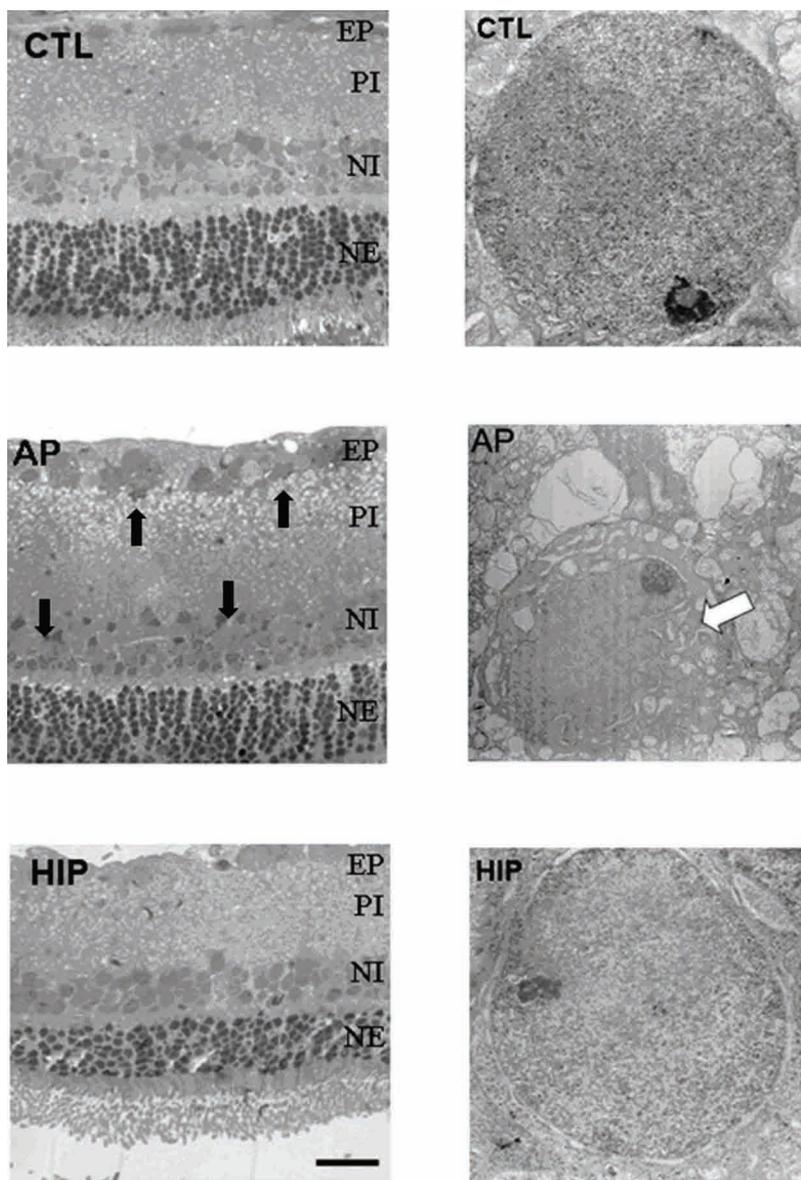
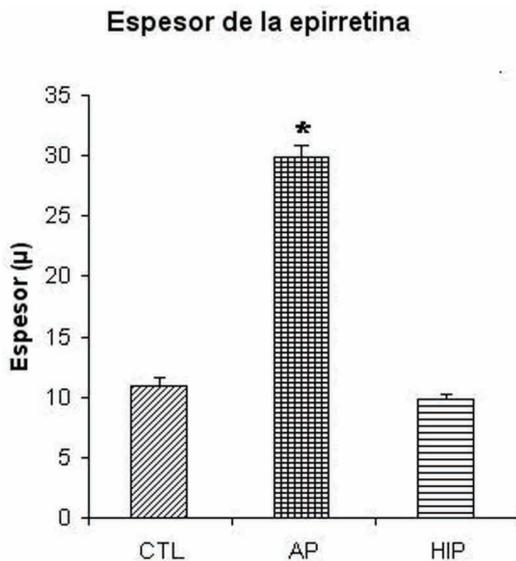


Gráfico : Diagrama de barras del espesor de la membrana epirretinal. Cambios en el grosor de la región más interna de la retina determinados mediante en los diferentes grupos experimentales. Se observa un aumento significativo en el espesor epirretinal de los animales AP, el cual no fue evidenciado en los animales HIP. * $p < 0.01$



Agradecimientos

Sra. Mariana López Ravasio por su excelente asistencia técnica.

A la Sociedad Argentina de Pediatría (SAP), por el financiamiento de M. R-F.

Al Dr. Alfredo Reca, por su desempeño profesional y calidad humana.

Trabajo dedicado a la memoria del Dr. Cleto E. M. Rey (1932-2007)

Bibliografía

- 1 Hill A (1991). *Current concepts of hypoxic-ischemic cerebral injury in the term newborn. Pediatric Neurol* 7: 317-325.
- 2 Younkin D. (1992). *Hypoxic-ischemic brain injury of the newborn-statement of the problem and overview. Brain Pathology* 2: 209-210.
- 3 Costello (1994). A. and Manandhar, D. *Perinatal asphyxia in less developed countries: annotation, Arch. Dis. Child*, 71: F1-3.
- 4 American Psychiatric Association (1987). *Diagnosis and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM III), Third Edition, Washington, DC. USA.*
- 5 Choi, DW. (1987). *Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. J. Neurosci* 7: 369-379.
- 6 Loidl C.F., Herrera-Marschitz M., Andersson K., You Z-B, Goiny M., O'Connor W.T., Bjelke B., Ungerstedt U. (1993) *Short and long-term effects of perinatal asphyxia in rats monitored with peripheral and intracerebral microdialysis. Amino Acids* 5: 167.
- 7 Capani F., Loidl CF, Aguirre F., Piehl L., Facorro G., Hager A., De Paoli T, Farach H., Pecci-Saavedra J. (2001). *Changes in reactive oxygen species (ROS) production in rat brain during global perinatal asphyxia: an ESR study. Brain Res.* 914: 204-207.
- 8 Capani F, Loidl CF Piehl L, Facorro G, De Paoli T, Hager (2003) *A Long term production of reactive oxygen species during perinatal asphyxia in the central nervous system: effects of hypothermia. Int J Neurosci* 113: 641-654.
- 9 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.*
- 10 Cebral E, Capani F, Selvin- Testa A, Rey Funes M, Coirini H, Loid CF (2006). *Light and electron microscopic alterations in the neostriatum cytoskeleton following perinatal asphyxia. Effects*

- of hypothermia treatment. *Inter. J. Neurosci.* 116(6):697-714.
- 11 Osborne N, Casson R, Wood J, Chidlow G, Graham M, Melena J. (2004). Retinal ischemia: mechanism of damage and potential therapeutic strategies. *Retinal Eye Res.* 23: 91-147.
- 12 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.
- 13 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.
- 14 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.
- 15 Gilbert C.I. (2001) Childhood Blindness in the context of VISION 2020-the right to sight. *Bull WHO Org.*;79(3):227-232.
- 16 Hardy P, Dumont I, Bhattacharya M, Hou X, Lachapelle P, Varma DR, Chemtob S. (2000) Oxidants, NO and prostamoids in the developing ocular vasculature: a basis for isquemic retinopathy. *Cardiovasc Res.* 18;47(3):489-509.
- 17 Jankov R.P. et al. (2001) Antioxidants as therapy in the newborn. *Ped Res* 50;681-687.
- 18 Smith L.E. (2003). Pathogenesis of retinopathy of prematurity. *Sem in Neonat* 8, 469-473.
- 19 Loidl C.F. (1997) Short and long term effects of perinatal asphyxia. Thesis. Maastricht University, Netherland.
- 20 Loidl C.F., De Vente J., van Dijk E., Vles SH, Steinbusch H and Blanco C. (1998). Hypothermia during or after severe perinatal asphyxia prevents increase in cyclic GMP-related nitric oxide levels in the newborn rat striatum. *Brain Res.* 791: 303-307.
- 21 Young R, Towfigh J (1983) The effect of grade hypothermia on hypoxic-ischemic brain damage: a neuropathologic study in :“ the neonatal rato *Stroke* 14: 929-934.
- 22 Nedegaard M, Goldman S, Desai Sand Pulsinelli W (1991). Acid induced death in neurons and glia. *Journal of Neuroscience* 11 (8): 2489-2497.
- 23 Westin B. (1971). Infant resuscitation and prevention of mental retardation. *Am J. Obstet Gynecol* 110: 1134-1138.
- 24 Dunn J., Miller J. (1969) Hypothermia combined with positive pressure ventilation in resuscitation of the asphyxiated neonate. *Am. J. Obs.& Gynec.* 104, 1: 58-67.
- 25 Globus M., Ginsberg M., Dietrich W., Busto R., Scheinberg P. (1987) Substantia nigra lesion protects against ischemic damage in the striatum. *Neurosci. Lett* 80: 251-256.
- 26 Globus M., Dietrich W., Busto R., Valdes I., Ginsberg M. (1989) The combined treatment with dopamine D1 antagonist (SCH 23390) and NMDA receptor blocker (MK 801) dramatically protects against ischemia-induced hippocampal damage. *J. Cereb. Blood Flow Metab* 9 (suppl 1), S5.
- 27 Sternberger L.A.S. (1986). *Immunohistochemistry*, 3ª edition, John Wiley, New York.
- 28 Schulenburg WE, Tsanaktisid G. (2004). Variations in the morphology of retinopathy of prematurity in extremely low birthweight infants. *Br J Ophthalmol.* 88(12):1500-1503.
- 29 Raju T (1992) Some animals models for the study of perinatal asphyxia. *Biol Neonate* 62: 202-214.
- 30 Palmer C, Vannucci RC. (1993). Potential therapies for perinatal cerebral hypoxia-ischemia. *Clin Perinatol* 20: 411-432.
- 31 Wilkinson-Berka JL (2004) Vasoactive factors and diabetic retinopathy: VEGF, cyclooxygenase-2 and nitric oxide. *Curr Pharm Des.*;10 (27) :3331-3348.

- 32 Porta M, Allione A. (2004) *Current approaches and perspectives in the medical treatment of diabetic retinopathy*. *Pharmacol Ther*.103 (2):167-177.
- 33 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.
- 34 Phelps DL, Lakatos L, Watts JL.(2000). *D-Penicillamine for preventing retinopathy in preterm infants*. *The Cochrane library*.
- 35 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.
- 36 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*.
- 37 *STOP ROP Multicenter Trial 2000 Supplemental Therapeutic Oxygen for Prethreshold Retinopathy Of Prematurity (STOP-ROP), a randomized, controlled trial. I: primary outcomes*. *Pediatrics*. ;105(2):295-310.
- 38 Howlett A, (2003). *Inositol para el SRD de prematuros*. *Cochrane Library, Issue 1*.
- 39 Nandgaunkar BN, Rotschild T, Yu K and Higgins RD.(1999) *Indomethacin improves oxygen-induced retinopathy in the mouse*. *Pediatr Res* 46(2):184-188.
- 40 Rotschild T, Nandgaonkar BN, Yu K, Higgins RD. (1999) *Dexamethasone reduces oxygen induced retinopathy in a mouse model*. *Pediatr Res*. 46(1):94-100.
- 41 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.