

# Efecto Terapéutico de la Melatonina en la Uveítis Experimental

Sande, Pablo Horacio\*; Fernandez, Diego Carlos\*; Chianelli, Mónica Silvia; Silberman, Dafne Magalí; de Zavalía, Nuria; Belforte, Nicolás; Salido, Ezequiel; Franco, Pablo J.; Dorfman, Damián; Lanzani, Florencia; Bordone, Melina; Keller Sarmiento, María Inés; Sáenz, Daniel Alberto; Rosenstein, Ruth Estela.

Autora responsable: Dra. Ruth E. Rosenstein  
Departamento de Bioquímica Humana,  
Facultad de Medicina, CEFyBO, UBA.  
Paraguay 2155, 5°P, (1121),  
Buenos Aires, ARGENTINA,  
TE: 54-11-4508-3672 (ext. 37),  
FAX: 54-11-4508-3672 (ext. 31),  
E-mail: ruthr@fmed.uba.ar

## RESUMEN

**Objetivos:** Analizar el efecto de la melatonina en la uveítis inducida por una inyección intravítrea de lipopolisacárido bacteriano (LPS) en el hámster dorado.

**Métodos:** Se implantó un pellet de melatonina dos horas antes de la inyección de LPS. La respuesta inflamatoria se evaluó en términos de: i) integridad de la barrera hemato-ocular, ii) signos clínicos, iii) estudios histopatológicos, y iv) función retiniana.

**Resultados:** La melatonina disminuyó los signos clínicos y la infiltración de proteínas y células en el segmento anterior, protegió la ultraestructura de las barreras hemato-oculares y los fotorreceptores, previno la disfunción electroretinográfica, y el aumento de la actividad retiniana de NOS y de TNF inducidos por LPS. La melatonina disminuyó el efecto del LPS sobre los niveles nucleares de las subunidades p50 y p65 del factor nuclear B.

**Conclusiones:** La melatonina podría constituir una nueva estrategia terapéutica para el tratamiento de la uveítis.

**Palabras clave:** melatonina, uveítis, modelo experimental, lipopolisacárido bacteriano, barrera hemato-ocular.

## ABSTRACT

**Objective:** To analyze the therapeutic effect of melatonin on uveitis induced by an intravitreal injection of bacterial lipopolysaccharide (LPS) in the golden hamster.

**Methods:** A pellet of melatonin was implanted subcutaneously two hours before the injection of LPS. One and eight days after injections, the inflammatory response was evaluated in terms of: i) integrity of blood-ocular barrier, ii) clinical signs, iii) histopathological studies, and iv) retinal function.

**Results:** Melatonin reduced the leakage of proteins and cells in the anterior segment of LPS-injected eyes, decreased clinical signs and protected the ultrastructure of blood-ocular barriers, and photoreceptors. Melatonin prevented the decrease in the electroretinographic activity induced by LPS. Melatonin significantly abrogated the LPS-induced increase in retinal NOS activity, tumor necrosis factor (TNF), and nuclear factor B (NFB) p50 and p65 subunits levels.

**Conclusions:** These results support the use of melatonin as a new therapeutic strategy for the treatment of uveitis.

**Key words:** melatonin, uveitis, experimental model, bacterial lipopolysaccharide, blood-ocular barrier.

## INTRODUCCIÓN

Uveítis es el término usado para describir distintas formas de inflamación de la túnica media-vascular, úvea o tracto uveal (coroides, iris y cuerpo ciliar). Existe una gran heterogeneidad en su expresión clínica y una gama variada de enfermedades asociadas que pueden provocar edema, aumento de la PIO y daño irreversible del tejido, con riesgo de ceguera.

Desde hace ya varias décadas, la comunidad científica internacional ha reconocido la importancia de disponer de modelos animales para el estudio de patologías humanas. La similitud de un proceso patológico en animales de experimentación, aún con diferencias respecto al humano, constituye una herramienta de valor indiscutible para la comprensión de un proceso en su contraparte humana. En la actualidad, existen dos tipos de

modelos experimentales que reproducen la etiología exógena o endógena de las diversas patologías asociadas a la uveítis: la uveítis autoinmune experimental (UAE) y la uveítis inducida por exotoxinas (UIE).

Se han empleado al menos cinco autoantígenos uveitogénicos en modelos experimentales de UAE, sin embargo, los más ampliamente utilizados y caracterizados son la proteína de unión al retinal del interfotorreceptor IRBP (interphotoreceptor retinoid binding protein) y el antígeno soluble retinal (S-retinal).<sup>1</sup> Ambas proteínas están presentes en el segmento externo de los FR, blanco principal del daño oxidativo. Estos potentes antígenos podrían estar también involucrados en uveítis humanas ya que se han detectado anticuerpos anti S-retinal en el suero de pacientes con uveítis.<sup>2</sup> La uveítis autoinmune experimental

(UAE) desencadena un proceso inflamatorio que afecta la región posterior del globo ocular y está mediada principalmente por células T colaboradoras (CD4+). Durante la UAE, se produce destrucción tisular con necrosis de células ganglionares y fotorreceptores.<sup>3</sup> Este modelo experimental ha sido ampliamente utilizado para evaluar el efecto de citoquinas inmunosupresoras y moduladores de citoquinas proinflamatorias como el TNF- $\alpha$  o la IL-1.<sup>4</sup> Además, existe un segundo tipo de modelo experimental de uveítis autoinmune, que se induce tras la inmunización con el antígeno asociado a melanina (MAA), y difiere de los demás, en que el proceso inflamatorio permanece sólo en la región anterior del globo ocular, sin afectar la retina y la coroides.<sup>5-6</sup>

Otro tipo de modelo animal ampliamente utilizado para el estudio de la uveítis, se basa en la administración sistémica de lipopolisacárido, un componente de la membrana externa de bacterias Gram-negativas (LPS).<sup>7</sup> La uveítis inducida por endotoxina en diversas especies, se caracteriza por una rápida infiltración de un gran número de polimorfonucleares neutrófilos y macrófagos, y por la liberación de proteínas a la cámara anterior tras la ruptura de la barrera hemato-ocular, alcanzando un pico inflamatorio a las 24 h.<sup>8</sup> Aunque la UIE fue originalmente utilizada como modelo de inflamación anterior, diversos estudios demostraron que el proceso inflamatorio afecta también la región posterior del ojo.<sup>9-10</sup>

Si bien ningún modelo animal reproduce el amplio espectro de procesos que tienen lugar en la uveítis humana, cada uno resulta ventajoso para la evaluación de ciertos aspectos específicos de la respuesta. La Tabla I reúne las características principales de cada uno de los modelos.

	MODELO DE UVEÍTIS EXPERIMENTAL		
	AUTOINMUNE		ENDOTOXINA
Inducida por	Inmunización con antígenos específicos del tejido: IRBP, S retinal	Inmunización con antígenos específicos del tejido: MMA	Administración sistémica de LPS bacteriano
Tipo de uveítis	Posterior	Anterior	Panuveítis
Tipo de respuesta	Específica	Específica	Aguda
Células que inician la respuesta	Linfocitos T y macrófagos	Linfocitos T y macrófagos	Macrófagos y neutrófilos

**Tabla I.** Resumen de las principales características de los distintos modelos experimentales de uveítis. MMA, antígeno asociado a melanina; IRBP, proteína de unión al retinal del interlo-torreceptor; S-retinal, antígeno soluble retinal.

Los corticoides son los fármacos más utilizados en la actualidad para el tratamiento de la uveítis humana. Sin embargo, su uso crónico a nivel ocular puede causar graves efectos secundarios, como por ejemplo el aumento de la PIO, que puede desencadenar glaucoma (glaucoma cortisónico). Esto ha llevado a buscar alternativas terapéuticas, entre las que se encuentran el uso de compuestos inmunosupresores, scavengers de radicales libres y moléculas antioxidantes.

La melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina), originalmente descrita por Lerner y col. en 1959.<sup>11</sup> Fue considerada durante mu-

cho tiempo de origen exclusivamente pineal.<sup>12</sup> Estudios posteriores demostraron que la melatonina es también sintetizada en diversos tejidos como la retina,<sup>13-17</sup> la glándula lagrimal y la glándula de Harder de diversas especies.<sup>18-19</sup> En nuestro laboratorio, se demostró por primera vez que la retina del hámster dorado es un sitio de síntesis activa de melatonina, independiente de la glándula pineal.<sup>17</sup> Una característica central de la biosíntesis de melatonina, tanto en la glándula pineal como en la retina de diversas especies, es su marcada influencia por el ciclo de luz/oscuridad, con valores máximos en la fase nocturna. Sin embargo, se ha demostrado que un oscilador circadiano endógeno regula paralelamente este proceso en la retina de diversas especies, incluido el hámster dorado.<sup>20-21</sup>

En la retina, la melatonina actúa como un neuromodulador autócrino o parácrino que podría regular diversos aspectos de la fisiología circadiana.<sup>22-24</sup> La melatonina inhibe la liberación de dopamina y de acetilcolina en las células amácrinas,<sup>25</sup> estimula la liberación de glutamato en FR,<sup>26</sup> activa la fagocitosis de los discos de membrana de los segmentos externos de los FR,<sup>27</sup> promueve los movimientos fotomecánicos de adaptación a la oscuridad en FR y en el EP de la retina de distintas especies,<sup>28</sup> afecta la supervivencia celular y modula la sensibilidad visual.<sup>23,29</sup> Además, la melatonina inhibe la producción de AMPc (segundo mensajero clave en la biosíntesis de melatonina) en la retina de pollo y de hámster y de este modo, podría regular su propia síntesis.<sup>17,23</sup> En trabajos previos de nuestro laboratorio, se ha demostrado que la melatonina incrementa los niveles retinianos de GMPc en el hámster (Faillace y col., 1996b). Por otra parte, se ha observado que este metoxiindol disminuye la onda c del electroretinograma y puede afectar el potencial de membrana del EP de retina de pollo directamente o a través de las células retinianas o de la coroides.<sup>30-31</sup>

En humanos, se ha descrito la presencia de receptores MT1 y receptores nucleares RZR/ROR $\alpha$  en varias células del sistema inmune.<sup>32</sup> Se ha postulado que a través de la interacción con estos receptores específicos, la melatonina podría tener una función regulatoria en la producción y liberación de mediadores inflamatorios, como la IL-2 y la IL-6.<sup>33</sup> La melatonina es una molécula lipofílica, que atraviesa todas las barreras morfofisiológicas, incluyendo la barrera hemato-ocular.<sup>34</sup> En este contexto, se ha evaluado su eficacia en la neuroprotección contra el daño generado por radicales libres en diversos modelos experimentales, incluyendo modelos de edema cerebral, isquemia-reperfusión y epilepsia post-traumática.<sup>35-37</sup> La melatonina es un potente inhibidor del sistema nitrérgico retiniano, dado que a concentraciones fisiológicas inhibe tanto el flujo de L-arginina (sustrato en la síntesis de NO), como la actividad de la NOS y el efecto de la L-arginina.<sup>38</sup> De hecho, se ha demostrado que la melatonina inhibe la expresión de la iNOS y protege contra el daño oxidativo en modelos experimentales en los que el NO es causa de destrucción molecular.<sup>39</sup> Recientemente, hemos demostrado que la melatonina modula significativamente la actividad del ciclo glutamato/glutamina en la retina de hámster.<sup>40</sup>

Sobre la base de las consideraciones mencionadas, el objetivo de este trabajo fue analizar el efecto de la melatonina sobre las consecuencias bioquímicas, clínicas, histológicas, ultraestructurales y funcionales de la uveítis experimental inducida por la administración intravítrea de LPS. Con el objeto de analizar el mecanismo de acción implicado en el efecto preventivo de la melatonina en la uveítis inducida por LPS en el hamster dorado.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### 1. Animales

Se utilizaron hámsteres dorados macho (*Mesocricetus auratus*) mantenidos bajo un fotoperíodo de 14 h de luz y 10 h de oscuridad (encendido de las luces a las 8.00 h). Los procedimientos fueron realizados según las Guías para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del National Institutes of Health (NIH).

### 2. Inducción de la uveítis experimental

Los animales se anestesiaron y con una aguja de 30G se inyectaron en el humor vítreo 2 µl de una solución de lipopolisacárido (LPS) de *Salmonella typhimurium* (Sigma-Aldrich, 0.5 mg/ml en solución salina estéril), en un ojo e igual volumen de vehículo (solución salina estéril) en el ojo contralateral.

Un grupo de hámsteres recibieron un implante subcutáneo de un pellet de melatonina (20 mg en 3 % v/w de aceite vegetal) comprimido en un cilindro de 4 mm de diámetro y 2 mm de longitud. A los animales del grupo control se les realizó la misma operación pero sin el implante del pellet de melatonina. La inyección de LPS o vehículo se realizó dos horas después de la implantación del pellet.

### 3. Células y proteínas en el humor acuoso

Luego de 24 h de la inyección de LPS o vehículo, se determinó el número de células y la concentración de proteínas en el humor acuoso. Para ello, luego del sacrificio de los animales se colectó inmediatamente el humor acuoso de cada ojo mediante una punción de la cámara anterior usando una aguja de 30G bajo un microscopio de cirugía.

### 4. Score clínico

Luego de 24 h de la inyección de LPS o vehículo, tres observadores independientes que desconocían el tratamiento aplicado en cada caso, examinaron ambos ojos de cada animal. Para la evaluación clínica, se consideraron los seis parámetros más frecuentemente utilizados en un examen oftalmológico de rutina, asignándoles un valor comprendido dentro de un rango según una escala arbitraria de gravedad que incluyó los siguientes aspectos: grado de hiperemia conjuntival: 0-3 y episcleral: 0-3, grado de inflamación de la córnea: 0-3, grado de alteración del iris y la pupila (vasodilatación, sinequia, presencia de exudados en el borde pupilar), y grado de constricción pupilar (miosis): 0-3. La presencia de cataratas se evaluó asignando un valor de 1 ó 2 según el compromiso, y 0 en caso de ausencia. Finalmente, se analizó el grado de opacidad del segmento posterior:

0-2. Se promediaron los resultados obtenidos por los tres observadores y se asignó el valor resultante a cada ojo. Para la evaluación de cada grupo, se promediaron estos valores. De este modo, se obtuvo un valor de score clínico para cada ojo y cada grupo, siendo 16 el número más alto.

### 5. Análisis histológico

Se sacrificaron animales a las 24 h y a los 8 días después de la inyección de LPS o vehículo, con o sin melatonina. Los ojos se procesaron en forma habitual para estudio histopatológico y se tiñeron con hematoxilina-eosina. Se caracterizaron las regiones del globo ocular con inflamación. El grado de inflamación de la retina para cada grupo se analizó mediante la evaluación del espesor de la retina total y cada capa en particular.

Asimismo, se evaluó el grado de infiltración celular, cuantificando el número de polimorfonucleares neutrófilos y de macrófagos presentes en las capas de los segmentos externos e internos de los fotorreceptores y en ambas plexiformes. Finalmente, se evaluó el grado de hemorragia retiniana mediante la tinción específica de la hemoglobina en secciones histológicas (alizarin red S).

La determinación de células gliales se realizó con inmunohistoquímica utilizando anticuerpos vimentina y proteína gliofibrilar ácida (GFAP). La densidad de células de Müller se determinó contando el número de prolongaciones vimentina-positivas en la capa plexiforme interna.

#### Análisis ultraestructural

Se evaluó la ultraestructura de los fotorreceptores y el epitelio pigmentario en ojos de animales inyectados 8 días antes con LPS o vehículo, con o sin melatonina. Las secciones se analizaron en un microscopio electrónico (ME) Zeiss M-109 Turbo de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires. Se analizó la integridad de la barrera hemato-ocular luego de 24 h de la inyección intravítrea de LPS o vehículo, en animales con o sin implante de melatonina mediante el uso de la técnica de lantano.

### 6. Estudio funcional

Se analizó la actividad electroretinográfica en hámsteres adaptados a la oscuridad, de acuerdo al método descripto (Jaliffa y col., 2005). Los animales se mantuvieron en oscuridad por 6 h. Todos los registros se realizaron dentro de los 20 min seguidos a la inducción de la anestesia y con la pupila dilatada. Los electroretinogramas (ERGs) de ambos ojos se registraron simultáneamente y en completa oscuridad. Para ello, se aplicaron 20 pulsos de luz blanca sin atenuación (5 ms, 0,2 Hz) generados por un estimulador fótico de diodos aplicados con una intensidad máxima de 350 cd seg m<sup>-2</sup>. Los registros se amplificaron utilizando un equipo Akonic BIO-PC (Akonic, Argentina).

La señal se registró con una ganancia de 100 V, sin atenuación, con filtros de ruido (50Hz) y filtros de alta (1000 Hz) y baja frecuencia (1,5 Hz) para optimizar el registro. Se determinó la amplitud de la onda-a como la diferencia en amplitud entre la subida y la caída

de la onda-a, y la amplitud de la onda-b como la diferencia entre la caída de la onda-a y el pico de la onda-b. La respuesta electroretinográfica se obtuvo como el promedio de los valores de cada corrida. Se realizaron tres estímulos, con un intervalo de 5 min.

### 7. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante un análisis de varianza a dos vías (ANOVA), seguido de un test de Tukey.

## RESULTADOS

### Caracterización de la respuesta inflamatoria aguda de la inyección de LPS.

En una primera serie de experimentos, se determinaron dos parámetros característicos de inflamación ocular. Luego de 24 h, la administración intravítrea de LPS indujo un aumento significativo en el número de células y la concentración de proteínas en el humor acuoso. La implantación de un pellet subcutáneo de melatonina, que careció de efecto per se, redujo significativamente el efecto del LPS. No se observaron diferencias significativas entre el grupo control y el tratado con LPS en presencia de melatonina.

Luego de 24 h de la inyección intravítrea de LPS, se observaron diversas alteraciones clínicas que incluyeron hiperemia conjuntival, alteraciones de vasos episclerales, córnea, iris, cristalino y segmento posterior. El score clínico fue significativamente mayor en el grupo de ojos inyectados con LPS que los inyectados con vehículo. El pretratamiento con melatonina redujo significativamente este parámetro.

El análisis histológico de retinas la inyección intravítrea de LPS provocó una severa inflamación a lo largo de toda la capa media, que afectó además, la esclerótica, la región del limbo, la retina y el humor vítreo, donde se observaron infiltrados densos de células inflamatorias. En la retina de estos animales, se observó un alto número de células infiltradas, desorganización celular y alteración de las capas retinianas, que regularmente presentaron edemas y hemorragia. En el grupo de ojos inyectados con LPS de animales implantados con el pellet de melatonina, la inflamación resultó comparativamente más leve, con menor infiltración celular. La presencia de melatonina redujo significativamente estos parámetros, alcanzando valores similares a los de retinas control (Tabla II).

En el grupo de ojos inyectados con LPS, se observó un aumento significativo en el número de células infiltradas, tanto en la región de los segmentos externos de los fotorreceptores como en la capa plexiforme interna, que mayoritariamente correspondieron a polimorfonucleares neutrófilos (94,4% neutrófilos, 5,3% macrófagos). El pretratamiento con melatonina revirtió completamente el efecto del LPS.

En retinas de animales inyectados con LPS, la incidencia de hemorragias fue significativamente mayor que en los controles, con focos de hemorrágicos localizados principalmente sobre el epitelio pigmentario y en la zona de vasos retinianos. Las ma-

yores áreas hemorrágicas se observaron en las regiones de la retina cercanas a la papila óptica. En el grupo tratado con melatonina se observó menor incidencia de hemorragia, con focos pequeños, presentes sólo en la capa nuclear interna. Los resultados obtenidos para este grupo, si bien fueron mayores que en el grupo control, resultaron significativamente menores a los del grupo LPS en ausencia de melatonina.

En condiciones agudas de inflamación (luego de 24 h de la inyección de LPS), no se observaron variaciones en la estructura de las células de Müller o en su densidad mediante inmunohistoquímica. En estas condiciones, la expresión de GFAP tampoco presentó diferencias evidentes entre los grupos experimentales. En todas las retinas analizadas, la inmunoreactividad para GFAP se limitó a astrocitos, localizados en la membrana limitante interna, y no se observó marca en células de Müller. Luego de 8 días de la inyección de LPS, se observó un aumento evidente en la inmunomarcación con el anticuerpo anti-GFAP en células de Müller. El tratamiento con melatonina disminuyó en forma manifiesta la inmunomarcación de las células de Müller, que se marcaron débilmente y sólo en regiones retinianas restringidas. La melatonina careció de efecto per se sobre la expresión de GFAP, tanto a las 24 h como a los 8 días de tratamiento. Además, la densidad de células de Müller no se encontró significativamente alterada para ningún tratamiento comparado con el grupo control ( $18 \pm 3$  células/100  $\mu\text{m}$ ).

En el caso de ojos inyectados con LPS, en la zona del epitelio pigmentario (EP) se observó marca de lantano dentro de las células, principalmente a nivel del laberinto basal, que atravesó la barrera celular con marca en las microvellosidades apicales y en los espacios delimitados por los segmentos externos de los fotorreceptores. El tratamiento con melatonina revirtió, al menos en parte, los efectos del LPS. Se observó que el lantano no alcanzó la lámina basa y una intensa marca de lantano depositado en la cara apical de las células del EP, sin ingresar a la célula. La unión entre las células se encontró libre de marca. El análisis de la barrera hemato-ocular interna de retinas de ojos inyectados con LPS, reveló una alteración de su integridad. El análisis de la barrera hemato-ocular anterior del grupo de ojos inyectados con LPS de animales implantados con el pellet de melatonina no presentó alteraciones conspicuas.

### Caracterización de la respuesta inflamatoria a los 8 días de la inyección de LPS

#### 2.1. Evaluación histológica

Luego de 8 días de la administración de la endotoxina, la gravedad del cuadro inflamatorio se redujo marcadamente. El espesor de la retina completa no resultó significativamente diferente del grupo control. Sin embargo, la desorganización de los segmentos externos de las fotorreceptores observada en la fase aguda persistió luego de 8 días de la inyección de la endotoxina, con un aumento significativo en su espesor (Tabla II). Se observaron regularmente desprendimientos de retina; en algunos casos la retina formó pliegues en los cuales los segmentos externos de

los fotorreceptores perdieron contigüidad con el EP. Los animales tratados con LPS en presencia de melatonina no mostraron diferencias respecto al control, tanto en el espesor de la retina como en el de cada una de sus capas. El número de células infiltradas en la retina para el grupo LPS fue elevado, fundamentalmente con presencia de macrófagos en la región de los segmentos externos de los fotorreceptores, reclutados mayoritariamente en las zonas de desprendimiento de retina. La melatonina redujo significativamente el número de macrófagos con respecto al LPS, aunque este parámetro fue mayor que en el control).

El análisis por microscopía electrónica de transmisión de retinas de animales inyectados con LPS reveló una gran desorganización de los segmentos externos de los fotorreceptores, con amplios espacios intercelulares en los que se encontraron cuerpos membranosos y macrófagos. La estructura de los discos membranosos también se encontró alterada, dispuestos de manera más laxa y con notable aumento del espacio intradiscal; incluso se encontraron porciones de los segmentos externos carentes de membrana externa.

Los segmentos externos de los fotorreceptores de los animales tratados con LPS en presencia de melatonina no exhibieron diferencias estructurales respecto al control. No obstante, se observó un gran número de fagosomas lamelares, cuyo interior presentó una organización de discos apilados semejante a la de los segmentos externos, sugiriendo una activa fagocitosis de los segmentos externos de los fotorreceptores.

Los registros electrorretinográficos (ERGs) escotópicos 8 días de animales inyectados con LPS presentó una disminución significativa de ambos parámetros. El tratamiento con melatonina, que careció de efecto per se, disminuyó significativamente las alteraciones funcionales inducidas por LPS. No se observaron cambios significativos en las latencias de ambas ondas para ninguno de los grupos experimentales.

Luego de 3 h de la inyección, el LPS indujo un aumento significativo en los niveles, nucleares de las subunidades p50 and p65 de NFκB retinales, en tanto que la melatonina previno el efecto del LPS. Con respecto a los niveles retinianos de melatonina a diferentes períodos luego de la implantación del pellet del metoxiindol, se observó un aumento significativo de este parámetro a las 24 h pero no a los 8 días de la implantación del pellet. Los resultados obtenidos fueron: control (sin pellet):  $0.21 \pm 0.02$ , 24 h luego de la implantación del pellet:  $0.33 \pm 0.03$ , y 8 días luego de la implantación del pellet:  $0.26 \pm 0.02$  ng melatonina/mg prot.; n: 8 retinas/grupo).

## DISCUSIÓN

En este trabajo, hemos demostrado que la melatonina previene las consecuencias bioquímicas, clínicas, histológicas, ultraestructurales y funcionales de la uveítis experimental inducida por la administración intravítrea de LPS en el hámster dorado. Cabe señalar que la elección del hámster dorado para el desarrollo de este trabajo se fundamentó en la pigmentación y su reconocido uso para el estudio de los efectos de la melatonina.

En trabajos previos de nuestro laboratorio, hemos examinado exhaustivamente la biosíntesis y el mecanismo de acción de la melatonina en la retina del hámster dorado.<sup>38,40-41</sup> La experiencia adquirida en los estudios previos en esta especie, constituyó un factor adicional de consideración para la elección de este modelo. Trabajos previos de otros autores han demostrado que la administración de LPS en ratas, ratones y conejos induce una serie de cambios compatibles con algunos de las características observadas en la uveítis humana.<sup>42-44</sup> Sin embargo, en la mayoría de estos trabajos, la administración de LPS se realizó por vía sistémica generando una respuesta inflamatoria general. En este trabajo se optó por una administración intravítrea de la endotoxina con el objeto de minimizar los efectos de la inflamación sistémica, y además, aumentar considerablemente la supervivencia de los animales. Una ventaja adicional de la administración intravítrea, es que en el caso del estudio del efecto del LPS se pudo utilizar el ojo contralateral como control. Este último aspecto no fue posible en los animales tratados con melatonina por implantación con un pellet subcutáneo y en ese caso, se recurrió al uso de animales independientes como controles.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, confirman la validez de esta hipótesis en el hámster. En forma aguda, la inyección de LPS indujo un aumento en la concentración de proteínas y en el número de células en el humor vítreo. Ambos parámetros son indicadores clásicos de uveítis humana y experimental, y constituyen una evidencia sólida de la disrupción de la barrera hemato-ocular. Mediante el análisis histológico, se observó que al igual que en el humor vítreo, en la retina y en la región del limbo esclerocorneal, el número de células inflamatorias infiltradas fue muy elevado. La identificación histomorfológica de los tipos celulares infiltrados indicó una preponderancia de neutrófilos en la fase aguda y de macrófagos en la fase crónica, en concordancia con lo descrito en modelos de uveítis inducida por endotoxina en otras especies.<sup>45-46</sup> En las retinas de ojos inyectados con LPS se observaron severas alteraciones estructurales similares a las observadas en ciertos tipos de uveítis humanas. Las lesiones involucraron desprendimientos y pliegues de retina, así como daño de fotorreceptores. En una fase temprana, se afectaron todas las capas retinianas, con un aumento marcado en su espesor. Además, se observaron edemas y focos de hemorragia, que aumentaron hacia la región del nervio óptico, lo que podría deberse a que la región de la retina cercana al disco óptico presenta vasos de mayor calibre.<sup>47</sup> El análisis clínico permitió observar alteraciones de los vasos episclerales y de los presentes en la región anterior de la úvea, además de vasculitis y retinitis. En suma, estos resultados indican que la inyección intravítrea de LPS desencadenó una respuesta inflamatoria aguda, caracterizada por la extravasación de proteínas al cuerpo vítreo e infiltración de células inflamatorias, principalmente polimorfonucleares neutrófilos, que afectan a toda la úvea, el cuerpo vítreo, la retina y la región del limbo esclerocorneal.

La fase crónica de la inflamación se evaluó a los 8 días de la

inyección del lipopolisacárido. El análisis histológico permitió observar una disminución de la inflamación en relación a la fase aguda. En el cuerpo vítreo se observó un número reducido de células, aunque se encontraron macrófagos en la retina y en la región del limbo esclerocorneal. A nivel óptico, se observó un aumento significativo en el espesor de la capa de fotorreceptores y frecuentes desprendimientos y pliegues de la retina. A nivel ultraestructural, se observó una gran alteración de los segmentos externos e internos de los fotorreceptores, con una marcada desorganización de los discos membranosos y un aumento en el espacio intercelular. En el EP se observaron edemas frecuentes. Para analizar la función retiniana se realizaron electroretinogramas escotópicos luego de 8 días de la inyección de LPS o vehículo, dado que la retina del hámster es una retina preponderante en bastones. El análisis electroretinográfico a las 24 h de la inyección de LPS se omitió, porque las alteraciones clínicas agudas a nivel del segmento anterior inducidas por LPS podían provocar registros falsos que no reflejaran la función retiniana. El estudio electrofisiológico de ojos inyectados con LPS demostró una disminución en la amplitud tanto de la onda-a como de la onda-b, que probablemente refleja una alteración funcional de los fotorreceptores y células de las capas internas de la retina, particularmente células bipolares y de Müller, respectivamente.

A pesar de una disminución de la inflamación en períodos posteriores a las 24 h, los resultados indican que la administración intravítrea de LPS provocó un daño retiniano crónico, en particular de los fotorreceptores, afectando su estructura y función. El desprendimiento frecuente de los segmentos externos del EP, tiene consecuencias no sólo funcionales, sino que podría desencadenar la muerte de fotorreceptores por falta de nutrición y recambio normal.<sup>48</sup> Este conjunto de resultados indica que la administración intravítrea de LPS desencadena una respuesta inflamatoria ocular florida sobre todo en forma aguda, y aunque esta respuesta decae con el tiempo, persisten secuelas funcionales e histológicas de consideración. Asimismo, estos resultados indican que la inyección intravítrea de LPS reproduce aspectos centrales de la uveítis humana y por lo tanto, este modelo podría permitir avances en el estudio de nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de esta enfermedad.

Se dispone de abundantes evidencias sobre el efecto de la melatonina como antioxidante, antinitrergico e inhibidor de la síntesis de prostaglandinas, entre otros mecanismos anti-inflamatorios asociados a este metoxiindol. Por lo tanto, se consideró de interés el estudio del efecto terapéutico de la melatonina en el modelo de uveítis experimental inducida por LPS en el hámster dorado. En una serie preliminar de experimentos se intentó una aplicación diaria por vía subcutánea, que debió ser descartada por las lesiones dérmicas provocadas en los animales luego de inyecciones repetidas, tanto de melatonina como de vehículo. Por esta razón, se optó por la implantación de un pellet subcutáneo conteniendo el metoxiindol. El pellet de melatonina revirtió significativamente los efectos agudos causados

por LPS. En los animales tratados con melatonina, se observó una menor infiltración de células y proteínas en el cuerpo vítreo, lo que podría sugerir una preservación de la integridad de la barrera hemato-ocular. El análisis clínico e histológico reveló signos leves de inflamación y protección de todas las estructuras del globo ocular. Asimismo, el tratamiento con melatonina preservó notablemente la estructura celular retiniana y previno la disminución de la actividad electroretinográfica de los ojos inyectados con LPS. Si bien en presencia de melatonina se observó un número considerable de macrófagos en la región de los segmentos externos de los FR, este número fue significativamente menor al correspondiente al grupo de LPS sin melatonina. En el EP de los animales tratados con melatonina se observaron frecuentemente fagosomas, conteniendo material fagocitado de segmentos externos de fotorreceptores, lo que sugiere una activa renovación de los discos de membrana y reparación del tejido.

En condiciones normales, las células de Müller expresan niveles bajos o no detectables de GFAP. Sin embargo, en modelos en los que se altera la homeostasis retiniana, por aumento de la PIO, desprendimiento de retina, o retinopatía diabética, los niveles de esta proteína aumentan marcadamente.<sup>49-51</sup> En los ojos tratados con LPS se observó un aumento en la inmunomarcación de GFAP, tanto en astrocitos como en células de Müller, que fue revertido por el tratamiento con melatonina. En concordancia con este resultado, se ha demostrado que la melatonina reduce la reactividad de células gliales.<sup>52-53</sup>

La variación en la expresión de vimentina, proteína que en la retina se expresa exclusivamente en células de Müller, ha sido asociada a una respuesta de diferenciación y proliferación glial.<sup>54</sup> En el modelo de uveítis inducida por la inyección intravítrea de LPS, no se observaron variaciones en la expresión de vimentina para ningún tratamiento, tanto a las 24 h como a los 8 días, lo que permite descartar proliferación de células de Müller en estas condiciones.

Los resultados de la marca con lantano demostraron que en retinas de ojos inyectados con LPS, se produjo una disrupción de la barrera hemato-ocular interna y externa; mientras que el tratamiento con melatonina preservó la integridad de ambas barreras. En los capilares de la retina interna, la presencia de uniones funcionales, fundamentalmente del tipo oclusivas en las células endoteliales, podría impedir el pasaje de lantano. Sorprendentemente, se observó que en la zona de la barrera externa, la mayor parte del lantano se depositó sobre la membrana de Bruch, observándose escasa marca electrón-densa en el laberinto basal de las células del EP. En base a esta observación, es factible que la barrera externa no sólo esté comprendida por la presencia de uniones oclusivas entre las células del EP, sino que además participe la membrana de Bruch, que constituiría el primer punto de obstrucción para el pasaje de células o proteínas presentes en el lumen de los coriocapilares.

Clínicamente, los corticoides constituyen la alternativa terapéutica más utilizada para el tratamiento de la uveítis humana. Sin embar-

go, su efecto inmunosupresor puede agravar el desarrollo de la enfermedad y su uso crónico a nivel ocular puede ocasionar efectos secundarios considerables, como cataratas y aumento de la PIO, con riesgo de desencadenar un glaucoma cortisónico.<sup>55-56</sup> Si bien se han estudiado diversas drogas no esteroideas, como la ciclosporina A o la indometacina como agentes antiinflamatorios, estos compuestos pueden retrasar el proceso de cicatrización o bien generar insuficiencia o necrosis papilar renal aguda, inhibición de la agregación plaquetaria, hemorragia gastrointestinal y ulceración, entre otros.<sup>56-57</sup> Por lo tanto, a pesar de la variedad de recursos farmacológicos disponibles, aún existe controversia en el tratamiento médico de la uveítis. El conjunto de resultados obtenidos en este trabajo indican que la melatonina previene significativamente las alteraciones clínicas, bioquímicas, fisiológicas, estructurales y ultraestructurales en la UIE en el hámster dorado.

Queda aún por elucidar el (los) mecanismo(s) de acción de la melatonina en la prevención de las consecuencias de un proceso inflamatorio ocular. El LPS estimula la producción de citoquinas pro-inflamatorias, incluyendo TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-8, y enzimas pro-inflamatorias, como la iNOS. La activación del NF- $\kappa$ B provoca aumento de la expresión de estas moléculas en células inflamatorias, y en células endoteliales además, estimula la expresión de moléculas de adhesión leucocitaria y moléculas de adhesión intercelular.<sup>44,58-59</sup> La administración de melatonina disminuye la producción de moléculas de adhesión de leucocitos, citoquinas proinflamatorias, estimula diversas enzimas antioxidantes e inhibe enzimas prooxidantes, como la NOS.<sup>60-61</sup> Dentro de su amplia gama de efectos moduladores, se demostró que la melatonina reduce específicamente los niveles de TNF- $\alpha$ , una de las citoquinas clave en el desencadenamiento del proceso inflamatorio. De hecho, estudios con anticuerpos anti-TNF- $\alpha$  demostraron una marcada reducción de la inflamación ocular.<sup>62</sup> Esta citoquina participa además, en la disrupción de la barrera hemato-ocular y estimula la expresión de iNOS.

En los últimos años se ha demostrado el efecto regulador de la melatonina sobre el sistema inmune.<sup>63</sup> Leucocitos y otras células del sistema inmune expresan receptores nucleares y de membrana para melatonina, que ejerce una función inmunomoduladora sobre citoquinas proinflamatorias. Sin embargo, estudios *in vitro* demostraron que la melatonina aumenta la producción de citoquinas proinflamatorias, IL-2 e IL-12, en cultivos de macrófagos.<sup>33</sup> Por otra parte, la melatonina podría contribuir a estabilizar la barrera hemato-celular.<sup>64-65</sup>

De acuerdo a estas consideraciones, resulta evidente que la inflamación desencadenada por la inyección de LPS es un proceso sumamente complejo, que involucra una notable variedad de señales, algunas iniciadoras y otras de propagación, que se ponen "en marcha" en forma independiente y paralela, o bien que se encuentran causal y secuencialmente relacionadas entre sí. En este "escenario complejo", la protección inducida por melatonina podría concebirse al menos de tres maneras posibles: 1) por la inducción de distintas señales que antagonizan

algunas o todas las señales deletéreas, 2) a través de un mecanismo jerárquico, es decir a través de un mecanismo único que revierte el proceso en su etapa inicial y por lo tanto, desencadena un cierre prematuro o bien evita el inicio del ciclo inflamatorio y 3) por la combinación de ambos mecanismos. Al presente, no se dispone de evidencias concluyentes a favor de ninguna de estas alternativas. Como ya se ha mencionado repetidamente, la melatonina inhibe la producción de varias (incluso la mayoría) de las señales inflamatorias, como el NO, las especies reactivas del oxígeno (ROS), las prostaglandinas, y en algunos modelos experimentales, las citoquinas pro-inflamatorias, lo que podría sugerir un mecanismo pleiotrópico. Sin embargo, los resultados obtenidos mediante la técnica de lantano, podrían avalar un mecanismo alternativo, en el que el efecto primario de la melatonina consiste en mantener la integridad de la barrera hemato-ocular, lo que podría evitar (o reducir la magnitud) del proceso inflamatorio en una de las etapas más tempranas. En este sentido, se ha demostrado que la disrupción de la barrera es un evento anterior a la entrada de células inflamatorias.<sup>66</sup> El tratamiento con melatonina sola o combinada con corticoides podría beneficiar a pacientes con uveítis crónicas y disminuir el grado y la frecuencia de los efectos adversos de los corticoides. La uveítis es una consecuencia frecuente de la cirugía ocular (cataratas, o vitrectomía, entre otras), por lo tanto, aún como estrategia preventiva, el uso de melatonina como anti-inflamatorio ocular podría tener significación terapéutica. En este sentido, resultados preliminares obtenidos recientemente en nuestro laboratorio demuestran la efectividad de la melatonina aun cuando se administra en forma posterior a la inducción de la uveítis experimental.

Otro aspecto a analizar es la dosis de melatonina. En este trabajo se utilizaron dosis relativamente altas del metoxiindol, muy lejos de las concentraciones fisiológicas. En una aproximación grosera (y por ahora sin sustento experimental) podría asumirse que los 20 mg del pellet distribuidos a lo largo de 8 días, daría una dosis sistémica diaria de 2.5 mg. Si bien sigue siendo una dosis muy alta, al menos comparada con las concentraciones fisiológicas, ésta es la dosis diaria que se emplea en el uso humano de comprimidos de melatonina. Una ventaja adicional del uso de melatonina con fines terapéuticos es que este compuesto atraviesa libremente la barrera hemato-celular y carece de efectos tóxicos, aún en altas concentraciones.<sup>67</sup>

La búsqueda de modelos animales para la patología humana persigue tres objetivos esenciales: a) reproducir en condiciones controladas y con la mayor exactitud posible las características patológicas de la enfermedad que se pretende modelar, b) elucidar los mecanismos etiopatogénicos involucrados en el desarrollo de la enfermedad, y c) desarrollar terapias de nueva generación.

Aunque aún quedan sin resolver muchos interrogantes en el marco de los objetivos restantes, los resultados de este trabajo sugieren que la melatonina, un compuesto que probadamente carece de efectos tóxicos aun en altas concentraciones, podría constituir un recurso promisorio como estrategia de prevención

o eventualmente de tratamiento de la uveítis humana. Si bien al presente y como continuación de este trabajo, esta hipótesis está siendo sujeta a su demostración experimental, los resultados obtenidos podrían contribuir a responder algunos de los grandes interrogantes que quedan aún sin resolver en la fisiopatogenia de la uveítis 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 de esta enfermedad.

#### ABREVIATURAS UTILIZADAS

5-HT: serotonina; AA: ácido araquidónico; ACP: arterias ciliares posteriores; ACR: arteria central de la retina; CG: células ganglionares; EP: epitelio pigmentario; FR: fotorreceptores; GFAP: proteína glial ácida fibrilar; IL: interleuquina; INF- $\gamma$ : interferón gama; iNOS: óxido nítrico sintasa inducible; LPS: lipopolisacárido; MHC: complejo mayor de histocompatibilidad; NO: óxido nítrico; NOS: óxido nítrico sintasa; PIO: presión intraocular; ROS: especies reactivas del oxígeno; SOD: superóxido dismutasa; S-retinal: antígeno soluble retinal; TGF- $\beta$ : factor de crecimiento y diferenciación beta; TNF- $\alpha$ : factor de necrosis tumoral alfa; UAE: uveítis autoinmune experimental; UIE: uveítis inducida por endotoxina.

#### BILIOGRAFÍA

- JIANG HR, Lumsden L, Forrester J. **Macrophages and Dendritic Cells in IRBP-Induced Experimental Autoimmune Uveoretinitis in B10RIII Mice.** Invest Ophthalmol Vis Sci. 1999; 40: 3177-85.
- GUPTA D, Singh VK, Rajasingh J. **Cellular immune response of patients with juvenile chronic arthritis to retinal antigens and their synthetic peptides.** Immunol. Res. 1996; 15: 74-83.
- FORRESTER JV, Liversidge J, Dua HS, Towler H, McMenamin PG. **Comparison of clinical and experimental uveitis.** Curr Eye Res. 1990; 9:75-84.
- RIZZO LV, Silver P, Wiggert B, Hakim F, Gazzinelli RT, Chan CC, Caspi RR. **Establishment and characterization of a murine CD4 T cell line and clone that induce experimental autoimmune uveoretinitis in B10.A mice.** J. Immunol. 1996; 156: 1654-1660.
- BORA NS, Kim MC, Kabeer NH. **Experimental autoimmune anterior uveitis (EAAU): induction with melanin associated antigen from the iris and ciliary body.** Invest Ophthalmol Vis Sci. 1995; 36: 1056-1066.
- BROEKHUYSE RM, Winkens HJ, Kuhlmann ED. **Intraperitoneally injected melanin is highly uveitogenic.** Exp Eye Res; 1996. 62:199-200.
- ROSENBAUM JT, McDevitt HO, Guss RB, Egbert PR. **Endotoxin-induced uveitis in rats as a model for human disease.** Nature; 1980; 266:611-3.
- de VOS AF, Klaren VNA, Kijlstra A. **Expression of multiple cytokines and IL-1RA in the uvea and retina during endotoxin-induced uveitis in the rat.** Invest Ophthalmol Vis Sci. 1994;35:3873-83.
- YANG P, de-Vos AF, Kijlstra A. **Macrophages and MHC class II positive cells in the choroid during endotoxin induced uveitis.** Br J Ophthalmol. 1997;81:396-401.
- YAMASHIRO K, Kiryu J, Tsujikawa A, Honjo M, Nonaka A, Miyamoto K, Honda Y, Tanihara H, Ogura Y. **Inhibitory Effects of Antithrombin III against Leukocyte Rolling and Infiltration during Endotoxin-Induced Uveitis in Rats.** Invest Ophthalmol Vis Sci. 2001; 42:1553-60.
- LERNER AB, Case JD, Mori W, Wright MR. **Melatonin in peripheral nerve.** Nature. 1959;183:1821.
- AXELROD J. **The pineal gland: a neurochemical transducer.** Science. 1974;184:1341-8.
- QUAY WB. **Retinal and pineal hydroxyindole-o-methyl transferase activity in vertebrates.** Life Sci. 1965;4:983-91.
- CARDINALI DP, Rosner JM. **Retinal localization of the hydroxyindole-O-methyl transferase (HIOMT) in the rat.** Endocrinology. 1971; 89:301-3
- GERN WA, Ralph CL. **Melatonin synthesis by the retina.** Science. 1979; 204:183-4.
- PANG SF, Dubocovich ML, Brown GM. **Melatonin receptors in peripheral tissues: a new area of melatonin research.** Biol Signals. 1993;2:177-80.
- FAILLACE MP, Cutrera R, Sarmiento MI, Rosenstein RE. **Evidence for local synthesis of melatonin in golden hamster retina.** Neuroreport. 1995; 6: 2093-5
- MHATRE MC, van Jaarsveld AS, Reiter RJ. **Melatonin in the lacrimal gland: first demonstration and experimental manipulation.** Biochem Biophys Res Commun. 1988;153:1186-92.
- PÉVET P, Maleman MGM, Legerstree WC, Vivien-Roels B. **Circadian rhythmicity of the activity of hydroxyindole-O-methyl transferase (HIOMT) in the formation of melatonin and 5-methoxytryptophol in the pineal, retina, and harderian gland of the golden hamster.** J Neural Transm. 1980; 49:229-45.
- CAHILL GM. **Circadian regulation of melatonin production in cultured zebrafish pineal and retina.** Brain Res. 1996;708:177-81.
- TOSINI G, Menaker M. **Circadian rhythms in cultured mammalian retina.** Science. 1996; 272:419-21.
- BESHARSE JC, Spratt G, Reif-Lehrer L. **Effects of kynurenate and other excitatory amino acid antagonists as blockers of light- and kainate-induced retinal rod photoreceptor disc shedding.** J Comp Neurol. 1988;274:295-303.
- IUVONE PM, Chong NW, Bernard M, Brown AD, Thomas KB, Klein DC. **Melatonin biosynthesis in chicken retina. Regulation of tryptophan hydroxylase and arylalkylamine N-acetyltransferase.** Adv Exp Med Biol. 1999; 460: 31-41.
- TOSINI G. **Melatonin circadian rhythm in the retina of mammals.** Chronobiol Int. 2000;17:599-612
- SCHER J, Wankiewicz E, Brown GM, Fujieda H. **All amacrine cells express the MT1 melatonin receptor in human and macaque retina.** Exp Eye Res. 2003;77:375-82.
- FAILLACE MP, Keller Sarmiento MI, Rosenstein RE. **Melatonin effect on 3H glutamate uptake and release in the golden hamster retina.** J Neurochem. 1996. 67, 623-627.
- BESHARSE JC, Dunis DA. **Methoxyindoles and photoreceptor metabolism: activation of rod shedding.** Science. 1983;219:1341-3.
- PIERCE ME, Besharse JC. **Melatonin and rhythmic photoreceptor metabolism: melatonin-induced cone elongation is blocked at high light intensity.** Brain Res. 1987;405:400-4.
- MCGOOGAN JM, Cassone VM. **Circadian regulation of chick electroretinogram: effects of pinealectomy and exogenous melatonin.** Am J Physiol. 1999;277(5 Pt 2):R1418-27.
- TEXTORIUS O, Nilsson SE. **Effects of intraocular irrigation with melatonin on the c-wave of the direct current electroretinogram and on the standing potential of the eye in albino rabbits.** Doc Ophthalmol. 1987;65:97-111.
- NAO-I N, Nilsson SE, Gallemore RP, Steinberg RH. **Effects of melatonin on the chick retinal pigment epithelium: membrane potentials and light-evoked responses.** Exp Eye Res. 1989; 49:573-89.
- GARCIA-MAURINO S, Gonzalez-Haba MG, Calvo JR, Goberna R, Guerrero JM. **Involvement of nuclear binding sites for melatonin in the regulation of IL-2 and IL-6 production by human blood mononuclear cells.** J Neuroimmunol 1998; 92: 76-84.
- GARCIA-MAURINO S, Pozo D, Carrillo-Vico A, Calvo JR, Guerrero JM. **Melatonin activates Th1 lymphocytes by increasing IL-12 production.** Life Sci. 1999; 65, 2143-2150.
- REITER RJ, Tan DX, Sainz R. **Melatonin reducing the toxicity and increasing the efficacy of drugs.** J Pharm Pharmacol. 2002; 54:1299-1321.



35. PEI Z, Pang SF, Cheung RT. **Pretreatment with melatonin reduces volume of cerebral infarction in a rat middle cerebral artery occlusion stroke model.** J Pineal Res 2002; 32:168-172.
36. AKITANE M, Isao Y, Yasuko N, James W. **Natural antioxidants may prevent posttraumatic epilepsy: a proposal based on experimental animal studies.** Acta Medica Okayama. 2004; 58:111-118.
37. OZDEMIR D, Tugyan K, Uysal N et al. **Protective effect of melatonin against head trauma-induced hippocampal damage and spatial memory deficits in immature rats.** Neurosci Lett. 2005; 385:234-239.
38. SAENZ DA, Turjanski AG, Sacca GB. **Physiological concentrations of melatonin inhibit the nitridergic pathway in the Syrian hamster retina.** J Pineal Res. 2002. 33(1).
39. CUZZOCREA S, Zingarelli B, Gilad E, Hake P, Salzman AL, Szabó C. **Protective effect of melatonin in carrageenan-induced models of local inflammation: relationship to its inhibitory effect on nitric oxide production and its peroxynitrite scavenging activity.** J Pineal Res. 1997; 23:106-16.
40. SAENZ DA, Goldin AP, Mincos L, Chianelli M, Sarmiento MI, Rosenstein RE. **Effect of melatonin on the retinal glutamate/glutamine cycle in the golden hamster retina.** FASEB J. 2004. 18:1912-3.
41. FAILLACE MP, Keller Sarmiento MI, Nicola Siri L, Rosenstein RE. **Diurnal variations in cyclic AMP and melatonin content of golden hamster retina.** J. Neurochem. 1994. 62, 1995-2000.
42. BELLOT JL, Palmero M, Garcia-Cabanes C, Espi R, Hariton C, Orts A. **Additive effect of nitric oxide and prostaglandin-E2 synthesis inhibitors in endotoxin-induced uveitis in the rabbit.** Inflamm Res. 1996; 45:203-208.
43. LAUZURICA P, Martinez-Martinez S, Marazuela M. **Pyroolidine dithiocarbamate protects mice from lethal shock induced by LPS or TNF-alpha.** Eur J Immunol. 1999;29:1890-1900.
44. OHTA K, Nakayama K, Kurokawa T, Kikuchi T, Yoshimura N. **Inhibitory effects of pyrrolidine dithiocarbamate on endotoxin-induced uveitis in Lewis rats.** Invest. Ophthalmol Vis Sci. 2002; 43:744-750.
45. RAO NA. **Role of oxygen free radicals in retinal damage associated with experimental uveitis.** Trans Am Ophthalmol Soc. 1990;88: 797-850.
46. SHIMIZU K, Wu G, Sultana C, Kalra V, Rao N. **Stimulation of macrophages by retinal proteins: production of reactive nitrogen and oxygen metabolites.** Invest Ophthalmol Vis Sci. 1999; 40: 3215-3223.
47. NINOMIYA H, Inomata T. **Microvasculature of the hamster eye: scanning electron microscopy of vascular corrosion casts.** Veterinary Ophthalmology. 2005; 8:7-12.
48. ALI R, Sarra1 G, Stephens C, de Alwis M, Bainbridge J, Munro P, Fauser S, Reichel M, Kinnon C, Hunt D, Bhattacharya S, Thrasher A. **Restoration of photoreceptor ultrastructure and function in retinal degeneration slow mice by gene therapy.** Nature genetics. 2000; 25: 306-310.
49. OKADA M, Matsumura M, Ogino N, Honda Y. **Muller cells in detached human retina express glial fibrillary acidic protein and vimentin.** Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 1990;228:467-474.
50. MIZUTANI M, Gerhardinger C, Lorenzi M. **Muller cell changes in human diabetic retinopathy.** Diabetes. 1998;47:445-449.
51. KIM IB, Kim KY, Joo CK, Lee MY, Oh SJ, Chung JW, Chun MH. **Reaction of Muller cells after increased intraocular pressure in the rat retina.** Exp Brain Res. 1998;121:419-424.
52. BAYDAS G, Reiter RJ, Nedzvetskii VS, Nurush PA, Kirichendo SV. **Altered glial fibrillary acidic protein content and its degradation in the hippocampus, cortex and cerebellum of rats exposed to constant light: reversal by melatonin.** J Pineal Res. 2002. 33:134-139.
53. BAYDAS G, Reiter RJ, Yasar A, Tuzcu M, Gokdemir I, Nedzvetskii VS. **Melatonin reduces glial cell reactivity in the hippocampus, cortex and cerebellum of streptozotocin-induced diabetic rat.** Free Radic Biol Med. 2003; 35:797-804.
54. SCHIFFER D, Giordana MT, Mighell A, Giaccone G, Pezzotta S, Mauro A. **Glial fibrillary acidic protein and vimentin in the experimental glial reaction of the rat brain.** Brain Res. 1986;374:110-118.
55. GILMAN, A.G., Rall, T.W., Nies, A.S.y Taylor P. **The pharmacological basis of Therapeutics.** Ed Pergamon press, New York, 1990.
56. KUMAR M, Pandit J, Balasubramaniam J. **Novel therapeutic approaches for uveitis and retinitis.** J Pharm Sci. 2001; 4, 248-254.
57. NUSSENBLATT R, Whitcup SN, Palestine A. **Uveitis: Fundamental and clinical practice.** 2nd Ed. St. Louis, Mosby, 1996.
58. YANG P, De Vos AF, Kijlstra A. **Macrophages in the retina of normal Lewis rats and their dynamics after injection of lipopolysaccharide.** Invest Ophthalmol Vis Sci 1996;37:77-85.
59. KITAMEI H, Iwabuchi K, Namba K, Yoshida K, Yanagawa Y, Kitaichi N, Kitamura M, Ohno S, Onoe K. **Amelioration of Experimental autoimmune uveoretinitis (EAU) with an inhibitor of nuclear factor-B (NF-κB), pyrrolidine dithiocarbamate.** J Leucoc Biol. 2006; 79:1193-2001.
60. GITTO E, Romero C, Reiter RJ et al. **Melatonin reduces oxidative stress in surgical neonates.** J Pediatr Surg. 2004; 39:184-189.
61. REITER RJ, Tan DX, Leon J et al. **When melatonin gets on your nerves: Its beneficial actions in experimental models of stroke.** Exp Biol Med 2005; 230:104-117.
62. BAKER D, Butler D, Scallon BJ, O'Neill JK, Turk JL, Feldmann M. **Control of established experimental allergic encephalomyelitis by inhibition of tumor necrosis factor (TNF) activity within the central nervous system using monoclonal antibodies and TNF receptor- centralnoglobulin fusion proteins.** Eur J Immunol. 1994; 24: 2040-2048.
63. CARRILLO-VICO A, Garcia-Perganeda A, Naji L, Calvo JR, Romero MP, Guerrero JM. **Expression of membrane and nuclear melatonin receptor mRNA and protein in the mouse immune system.** Cell Mol Life Sci . 2003. 60, 2272-2278.
64. BENÍTEZ-KING G. **Melatonin as a cytoskeletal modulator: implications for cell physiology and disease.** Journal of Pineal Research, 2006; 40, 1-9.
65. CHEN H, Chen T, Lee M, Chen S, Hsu Y, Kuo Y, Chang G, Wu T, Lee E. **Melatonin decreases neurovascular oxidative/nitrosative damage and protects against early increases in the blood-brain barrier permeability after transient focal cerebral ischemia in mice.** J Pineal Res. 2006; 41: 175-182.
66. XU H, Forrest JV, Liversidge J, Crane IJ. **Lekocyte trafficking in experimental autoimmune uveitis: breakdown of blood-retinal barrier and upregulation of cellular adhesion molecules.** Invest Ophthalmol Vis Sci. 2003; 44:226-234.
67. MALDONADO M.D, Murillo-Cabezas F, Terron MP, Flores J, Tan D, Manchester LC, Reiter RJ. **The potential of melatonin in reducing morbidity-mortality after craniocerebral trauma.** J Pineal Res. 2007; 42: 1-11.