

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DEL NERVIÓ ÓPTICO EN EL RATÓN QUE SOBREENPRESA EL GEN P53. ANÁLISIS DE ESTRÉS OXIDATIVO

BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF THE OPTIC NERVE IN MICE OVEREXPRESSING THE P53 GEN. OXIDATIVE STRESS ASSAYS

GALLEGO-PINAZO R¹, ZANÓN-MORENO V², SANZ S³, ANDRÉS V³, SERRANO M⁴, GARCÍA-CAO I⁴, PINAZO-DURÁN MD⁵

RESUMEN

Objetivos: El gen supresor tumoral p53 detiene la proliferación y la muerte celular por apoptosis subsecuente a la acción de diversos factores, entre ellos el estrés oxidativo. La proteína p53 es fundamentalmente un regulador de la expresión génica. Utilizando ratones genéticamente manipulados para presentar una copia extra del gen p53 (transgénicos super p53) frente a ratones controles, hemos investigado el estado oxidativo y antioxidante en los nervios ópticos, en relación a p53.

Método: Se han utilizado ratones de la cepa C57BL/6 de 12 meses de edad en dos grupos: 1) grupo super p53 (Sp53) y 2) grupo de controles wild-type (GC). Los ratones fueron anestesiados en atmósfera de éter, extrayendo los globos oculares y nervios ópticos que se lavaron en PBS, manteniendo las muestras en nitrógeno líquido y en congelador de -85°C hasta su procesamiento. Se homogeneizaron 3-4 nervios ópticos por cada eppendorf, clasificando por grupos y determinando mediante métodos enzimático-colorimétricos la actividad

ABSTRACT

Purpose: The tumour inhibitor p53 gene has the ability of triggering proliferation arrest and cellular death by apoptosis subsequent to several factors, among them oxidative stress. The p53 protein is a major regulator of gene expression. Using genetically manipulated mice carrying an extra copy of gene p53 (transgenic mice super p53) versus control mice, we have investigated the generation of reactive oxygen species and antioxidant activity in the optic nerve of mice in relation to p53 availability.

Methods: We studied two groups of 12-month-old mice of the strain C57BL/6: 1) super p53 group (Sp53) and 2) wild-type control group (CG). Mice were anesthetized in ether atmosphere and the eyeball and retrobulbar optic nerves were excised, washed, soaked in PBS, and stored in liquid nitrogen at -85°C until processing. Three-four optic nerves from the same group were placed in an eppendorf tube, homogenized and enzymatic-colorimetric methods used to determine oxidative and antioxidant activities and the nitric oxide synthesis.

Recibido: 31/5/06. Aceptado: 17/1/08.

¹ Licenciado en Medicina. Residente de cuarto año de Oftalmología. Hospital Universitario La Fe. Valencia. Miembro de la Unidad de Investigación Oftalmológica Santiago Grisolfá. Valencia. España.

² Licenciado en Biología. Instituto de Biomedicina del CSIC. Valencia. Unidad Investigación Oftalmológica Santiago Grisolfá. Valencia. España.

³ Doctor en Biología. Instituto de Biomedicina del CSIC. Valencia. Centro Nacional de Biotecnología. Madrid. España.

⁴ Doctor en Biología. Centro Nacional de Biotecnología. Madrid. Hospital Punta de Europa. Área Sanitaria Campo de Gibraltar. Cádiz. España.

⁵ Doctor en Medicina. Oftalmólogo. Unidad Investigación Oftalmológica Santiago Grisolfá. Valencia. Hospital Punta de Europa. Área Sanitaria Campo de Gibraltar. Cádiz. España.

Correspondencia:

Roberto Gallego-Pinazo

Unidad Investigación Oftalmológica Santiago Grisolfá

Avda. Gaspar Aguilar, 90

46017 Valencia

España

E-mail: robertogallego@comv.es

peroxidativa y actividad antioxidante total y la concentración de óxido nítrico.

Resultados: Existe aumento significativo en la formación de radicales libres via peroxidación lipídica ($p < 0,001$), de la actividad antioxidante ($p < 0,001$) y síntesis de óxido nítrico ($p < 0,05$) en los nervios ópticos de los ratones transgénicos super p53, frente a los ratones controles.

Conclusiones: La presencia de una copia extra del gen p53 está ligada a modificaciones de la actividad redox en el nervio óptico del ratón, sugiriendo que p53 otorga una mayor resistencia a la agresión oxidativa. Valoramos la utilización de este modelo de ratón transgénico en procesos neurodegenerativos relacionados con el estrés oxidativo y la inducción de la apoptosis, como la neuropatía óptica glaucomatosa o la degeneración macular asociada a la edad.

Palabras clave: Gen p53, ratón super p53, estrés oxidativo, óxido nítrico, nervio óptico.

Results: A significant increase in free radical formation (via lipid peroxidation; $p < 0.001$), antioxidant activity ($p < 0.001$) and nitric oxide synthesis ($p < 0.001$) was found in the optic nerves from transgenic super p53 mice compared to respective controls.

Conclusion: The presence of an extra copy of the p53 gene correlated with redox status in the mouse optic nerve. This transgenic mouse could be useful as an experimental model to study cell resistance to neurodegenerative processes in relation to oxidative stress and to apoptosis induction, such as glaucomatous optic neuropathy or age-related macular degeneration (*Arch Soc Esp Oftalmol* 2008; 83: 105-112).

Key words: P53 gene, super p53 mice, oxidative stress, nitric oxide, optic nerve.

INTRODUCCIÓN

La proteína p53 tiene un peso molecular de 53 kD (de ahí su nombre) y su principal característica es que interviene directamente en el control del ciclo celular y en la replicación y reparación del ácido desoxirribonucleico (ADN), manteniendo la estabilidad genómica, activando la apoptosis y participando en la respuesta celular a agentes externos nocivos. La proteína p53 es fundamentalmente un regulador de la expresión génica, actuando como factor de transcripción capaz de activar o de inhibir genes específicos, entre los que destacan el gen p21, los genes bax y fas, el gen IGF-BP3 (insulin-like growth factor-binding protein-3), el gen gadd45 (growth arrest and DNA damage-45) y el gen de la ciclina G, todos ellos implicados en el ciclo de división celular y por ende en los procesos de proliferación y apoptosis (1,2). De estas mismas funciones deriva el hecho de que la proteína supresora de tumores p53 está relacionada con la prevención de cáncer, debido a su habilidad para regular la transformación, proliferación y muerte celular ante diversos agentes, entre ellos la agresión a los ácidos nucleicos y el estrés oncogénico (1-4). El gen p53 codifica la proteína p53 y en el genoma humano parecen existir unas 200 copias de este gen, localizadas en el cromosoma 17.

El daño al ADN puede proceder de agentes naturales exógenos (radiaciones ultravioleta, microorganismos) o endógenos (hipoxia, estrés oxidativo) y también de agentes químicos (fármacos, pesticidas, conservantes alimentarios, gases contaminantes, etc.). Entonces, ¿Cómo se produce el estímulo de p53 tras el daño inducido al ADN? Se ha postulado que p53 puede unirse al ADN de cadena sencilla y así localizar directamente la lesión, o bien que p53 actúe en respuesta a anomalías del metabolismo de los nucleótidos (1,2,5). También se ha demostrado que la proteína p53 se inactiva cuando aumenta la actividad oxidativa celular, y por ello se ha sugerido que la proteína p53 actuaría como sensor del estrés oxidativo endocelular (5,6), pudiendo mediar mecanismos de inducción o inhibición de la apoptosis en situaciones biológicamente favorables (1,2,7-9). Este concepto es particularmente interesante en oftalmología, ya que la apoptosis, o muerte celular programada, ha sido relacionada con diversos procesos, entre los más relevantes la muerte de las células ganglionares de la retina en el curso del glaucoma (10,11).

El proceso de apoptosis responde a la activación de mecanismos específicos que finalizan con la muerte celular (1,2,7-11). La activación del programa de suicidio celular implica la síntesis de moléculas específicas de ARN mensajero y su tra-

ducción correspondiente, lo que demuestra que la muerte celular está mediada por mecanismos intrínsecos intracelulares (4). En numerosos tipos celulares este proceso de apoptosis es dependiente del gen p53. De hecho, la activación de la proteína p53 dispara un programa transcripcional complejo que dependiendo del tipo celular y de las propiedades del medio, lleva a la detención del ciclo celular o bien a la muerte por apoptosis (7,9). La búsqueda del equilibrio entre los mecanismos que promueven la supervivencia celular y aquellos encaminados a su muerte, es el verdadero objetivo de muchos investigadores, ya que elucidar estos mecanismos puede ser la base de nuevas estrategias terapéuticas. Y en este sentido se ha demostrado que mutaciones promotoras de apoptosis durante el desarrollo del globo ocular provocan malformaciones congénitas, mientras que las que la inhiben suprimen la aparición de esos fenotipos (9,12).

Nos planteamos analizar las propiedades de la proteína p53, para intentar comprender su función en las enfermedades oculares neurodegenerativas, cuyos mecanismos etiopatogénicos aún permanecen sin esclarecer, entre ellas la atrofia óptica glaucomatosa, que por su morbilidad es causa principal de ceguera irreversible en todo el mundo. En este estudio hemos utilizado un modelo experimental en el ratón, que se ha manipulado genéticamente para poseer copias supernumerarias del gen p53 en forma de largos transgenes, obteniendo ratones transgénicos super p53 (Sp53) (3). Y como hemos expuesto anteriormente, ya que el aumento de la actividad oxidativa es capaz de inactivar la proteína p53 y que dicha proteína podría ser un marcador biológico del estrés oxidativo endocelular, regulando al mismo tiempo los procesos de inducción o inhibición de la apoptosis en situaciones propicias, pretendemos caracterizar bioquímicamente los nervios ópticos de los ratones Sp53, investigando si estos animales presentan variaciones respecto a las actividades redox de los ratones con genotipo no modificado.

SUJETOS, MATERIAL Y MÉTODO

En este estudio se ha utilizado el ratón como animal experimental. Todos los experimentos se han ajustado a las leyes Europeas para manipulación de animales (CE, 1986).

Características del modelo experimental

Se eligieron ratones de la cepa C57BL6/J, Charles River que se han manipulado genéticamente en el Centro Nacional de Biotecnología (Madrid) para poseer dos copias extra del gen p53 (super p53 tg/tg) según el método de García-Cao et al. (3). Para asegurar la utilidad del genotipo modificado hay que tener en cuenta que el alelo transgénico p53-tg cuando se presenta en un medio genético neutro para p53 llega a ser una replica funcional del gen endógeno, y así ha ocurrido con los ratones utilizados en este estudio. Además, los ratones Sp53 que poseían alelos p53-tg, además de los dos alelos endógenos, presentaban una respuesta mayor ante el daño infringido al ADN y demostraron estar más protegidos frente al cáncer que los ratones normales (3).

Por todo ello nuestro estudio se ha basado en la utilización del modelo de ratón transgénico generado mediante el uso de largos segmentos de ADN que contienen el gen p53 en su contexto genómico natural, para preservar al máximo las características del gen (3). El modelo de animal transgénico que sobreexpresa el gen p53 se caracterizó mediante genotipado por la reacción en cadena de la polimerasa (del inglés Polymerase Chain Reaction; PCR) e identificación de la banda específica que corresponde al gen supernumerario. En la figura 1 aparece una banda específica que confirma la presencia del transgen p53 adicional, conteniendo la región promotora de p53, de modo que su regulación es idéntica a la del gen p53 endógeno.

La funcionalidad del transgen se demostró in vivo e in vitro. El ratón super p53 muestra un desarrollo normal, es fértil y envejece normalmente con respecto al comportamiento de los animales controles, lo que se ha demostrado en todas las camadas a lo largo de este estudio y otros realizados con el mismo modelo experimental (3).

Obtención de las muestras

Los animales proceden del Centro Nacional de Biotecnología de Madrid y fueron mantenidos en condiciones estándar de laboratorio en el Instituto de Biomedicina del CSIC en Valencia. Se escogieron al azar 18 ratones de 12 meses de edad de ambos grupos de estudio (GSp53; n=9 vs GC; n=9), que fueron sacrificados exponiéndolos a atmósfera de éter durante unos minutos, extrayendo los 36 globos oculares y nervios ópticos que fueron congelados en

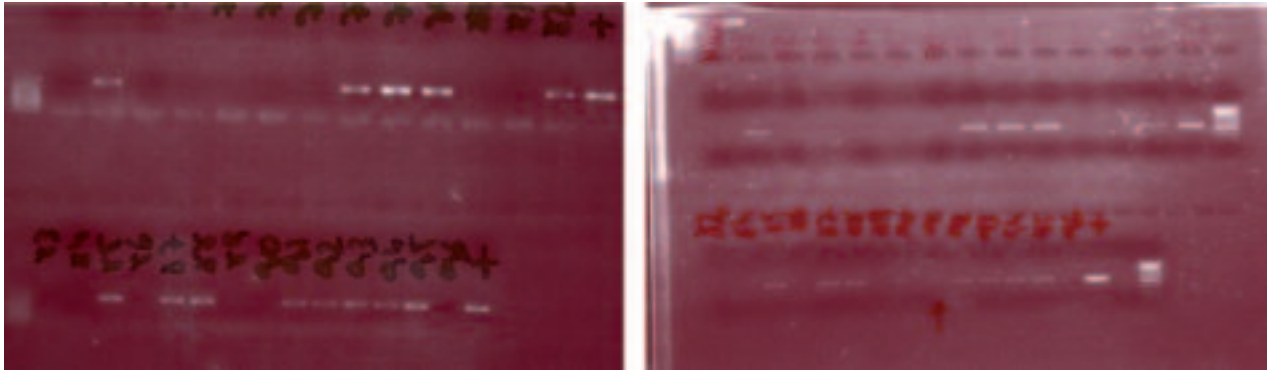
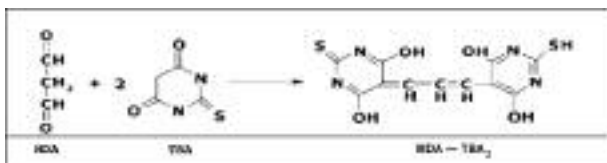


Fig. 1: Genotipado mediante PCR del ratón que sobreexpresa el gen p53.

nitrógeno líquido y almacenados a -85°C hasta su procesamiento, en los laboratorios de la Unidad de Investigación Oftalmológica «Santiago Grisolia» de Valencia. Los globos oculares se disecaron, separando los nervios ópticos que fueron homogenizados en eppendorfs conteniendo cada uno tres nervios ópticos y clasificándolos según los grupos de estudio. Mediante un ultraturrax, realizando pausas para evitar sobrecalentamientos y sobre hielo picado, se obtuvieron los homogenizados de tejido nervioso que destinamos a técnicas enzimático-colorimétricas para determinar el estado oxidativo y antioxidante y la determinación del óxido nítrico, según técnicas descritas por otros autores en diversos tejidos, aunque con modificaciones personales aplicadas al manejo de muestras oftalmológicas, como han sido descritas extensamente en trabajos anteriores de nuestro grupo (6-11). Básicamente la determinación del estado oxidativo se realizó mediante la determinación de los productos finales de la peroxidación lipídica, el malonildialdehído (MDA) y la técnica del ácido tiobarbitúrico y productos que reaccionan con él (TBARS). La solución conteniendo el homogenado se lleva a ebullición durante 1 h y el sobrenadante se extrajo con butanol. Una muestra (por triplicado) se depositó en placa multipocillos para su lectura espectrofluorométrica en citofluor a 544 nm excitación y 592 nm emisión. Las formulas de los metabolitos que forman parte de la reacción enzimático-colorimétrica son las siguientes:



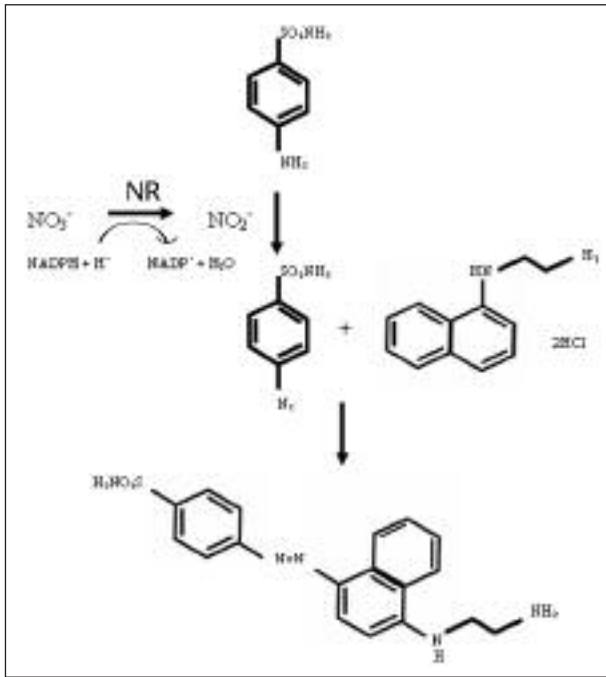
La determinación del estado antioxidante total (AOXT) se realizó mediante la determinación sumatoria de la capacidad antioxidante de la muestra, utilizando una combinación de reactivos específica que mide la actividad AOXT del tejido homogeneizado en cuestión y que es comercializada por *Randox labs*. La reacción final obtiene la medida de la actividad AOXT mediante un espectrofotómetro a 600 nm de longitud de onda.

La determinación del óxido nítrico total se realizó mediante un preparado comercial de *R&D Systems*. Este ensayo se basa en la conversión enzimática del nitrato a nitrito por medio del enzima nitrato reductasa. Tras la reacción se produce la determinación colorimétrica del nitrito por la reacción de Griess, que se basa en una reacción de diazotización en dos etapas: 1) acidificación del NO_2^- para producir un agente nitrosante y 2) reacción de este agente con ácido sulfanílico para producir ión diazonium, que se unirá al N-(1-naphthyl) ethylenediamine para formar un cromóforo que absorbe luz a 540-570 nm, y que puede ser medida.

El procesamiento estadístico de los datos se realizó mediante el programa Excel para Windows v 2003, Microsoft corporation (USA) y mediante el SPSS v 15.0 (Inc. Redmon WA, USA). Los grupos se compararon mediante el test t de student y el kolmogorov-Smirnov. Todos los datos se presentan como la media y desviación estandar. El nivel de confianza de la muestra fue del 95%.

RESULTADOS

La media de las determinaciones de la actividad oxidativa, mediante la vía de la peroxidación lipídi-



ca muestran el aumento significativo de los valores MDA-TBARS ($p < 0,001$) en los nervios ópticos del grupo Sp53, frente a los ratones controles (2,2 DE 0,6 vs 1,3 DE 0,2) como se demuestra en la figura 2.

La media de actividades antioxidantes totales de los homogeneizados de nervios ópticos fue significativamente mayor [AOXT ($p < 0,001$)] en el ratón Sp53 que en los controles (1,8 DE 0,4 vs 0,7 DE 0,1) que puede objetivarse en la figura 3.

La media de las determinaciones de la síntesis de óxido nítrico demostró el aumento significativo de los valores ($p < 0,001$) en los nervios ópticos del grupo Sp53, en relación a los valores de los nervios



Fig. 2: Determinación del MDA TBARS en ambos grupos de ratones. Los valores ($\mu\text{Mol/l}$) son media \pm desviación estandar. La significación se tomo al 95%.

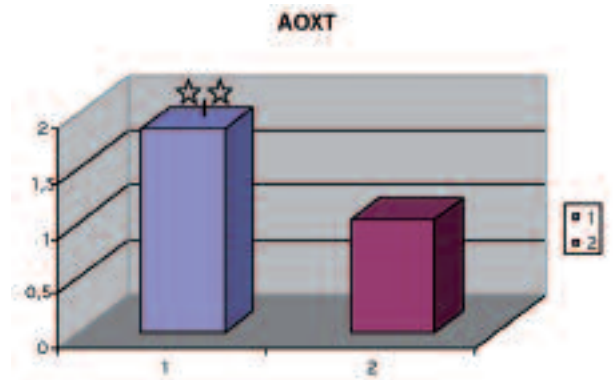


Fig. 3: Determinación de la actividad antioxidante total AOXT en los ratones. Los valores ($\mu\text{Mol/ml}$) son media \pm desviación estandar. La significación se tomo al 95%.

ópticos de animales wild type (143 DE 54 vs 105 DE 39), como se aprecia en la figura 4.

DISCUSIÓN

Mediante la utilización de modelos transgénicos, se puede profundizar en el conocimiento de los mecanismos de transmisión génica y en las fases del ciclo celular, así como obtener una base indispensable para el desarrollo de futuras terapias (1,19). El modelo que presentamos en este estudio, y que contiene una copia extra del gen que codifica la proteína p53, permite analizar ciertas características derivadas de las funciones de esta proteína y describir variaciones en relación a la presencia supernumeraria del gen p53 (3). Estudiando el nervio óptico en el ratón Sp53, hemos descrito el aumento en la formación de radicales libres por la

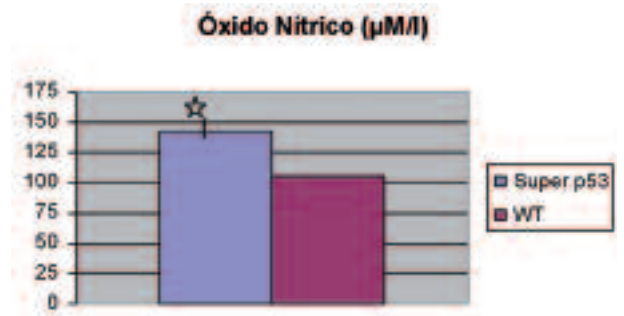


Fig. 4: Determinación del ON en ambos grupos de ratones. Los valores ($\mu\text{Mol/l}$) son media \pm desviación estandar. La significación se tomo al 95%.

via de la peroxidación lipídica (MDA-TBARS) y también el aumento en la capacidad AOXT y de la síntesis de óxido nítrico. Estos resultados demuestran que la presencia de una copia extra del gen p53 confiere unas características redox diferentes en el tejido estudiado que las observadas en los animales con genoma normal. En este sentido, Lotem et al. (8) han demostrado que la apoptosis inducida por p53 en células de leucemia mieloide pueden ser inhibidas por las citocinas IL6, IL3 e interferon γ y por antioxidantes. Estos autores han descrito en *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, que los antioxidantes y citoquinas muestran un efecto protector frente a la inducción de apoptosis. Parece que estas células que poseen un nivel intrínseco elevado de producción de peróxidos y mayor sensibilidad a apoptosis, requieren mayor concentración de citoquinas para inhibirla. De forma que disminuyendo el estrés oxidativo en las células administrando antioxidantes se inhibe la apoptosis, mientras que aumentando el estrés intrínseco mediante adición de peróxido de hidrógeno se estimula la apoptosis. Así quedaría demostrado que el grado intrínseco de estrés oxidativo puede regular la susceptibilidad celular a la inducción de apoptosis dependiente del gen p53, como se ha sugerido con anterioridad (3,7-9). Y de nuestros resultados se deduce que en los nervios ópticos de los ratones Sp53 existe una mayor capacidad oxidativa, pero también una aún mayor actividad antioxidante, cuando se compararon con los resultados bioquímicos enzimático-colorimétricos obtenidos de los nervios ópticos de ratones controles con una dotación normal del gen p53. Esto sugiere que la presencia supernumeraria del gen se traduce en el tejido nervioso estudiado en un aumento de la actividad de la proteína p53 y bioquímicamente en el aumento significativo de las defensas antioxidantes de las células frente a la agresión oxidativa. Por lo tanto, esta proteína actuaría en el nervio óptico de forma similar a lo descrito en otros tejidos, regulando la susceptibilidad celular al estrés oxidativo y posiblemente a la inducción de la apoptosis dependiente de este proceso. La proteína p53 es fundamental para entender la resistencia tisular a la formación de especies reactivas del oxígeno en los nervios ópticos y de su estudio depende como luchar frente a la inducción de apoptosis dependiente de redox.

Por otra parte el aumento significativo de la síntesis de óxido nítrico en los nervios ópticos del grupo Sp53 concuerda con los resultados obtenidos en

el humor acuoso de pacientes con glaucoma primario de ángulo abierto (20). Conforme se desarrolla el glaucoma disminuye el aporte de neurotrofinas a las células ganglionares de la retina. Este mecanismo forma parte de una serie de acontecimientos asociados a la PIO elevada, entre los que se incluyen la isquemia, disfunción vascular, y liberación de citocinas y de moléculas con efecto citotóxico como el glutamato. El principal propósito de la terapia neuroprotectora es interrumpir esta secuencia de hechos en uno o varios puntos. De hecho, Neufeld y cols., de la Universidad de Washington (20) han demostrado que el exceso de ON se asocia con aumento de la PIO y con otros signos de glaucoma, mientras que el bloqueo de la síntesis de ON previene o retrasa la evolución de la enfermedad glaucomatosa. La pregunta es ¿ON es el efector del daño en las células ganglionares o aparece como un producto metabólico de tal daño? Parece que el mecanismo es que el ON induce la lesión y muerte de las células ganglionares independientemente del aumento de la PIO o del control tensional, y este es un punto a tener en cuenta cuando analizamos la acción de los fármacos antiglaucomatosos actuales y también para afrontar futuras terapias antiglaucomatosas.

El ON es un potente activador de la proteína p53. No obstante, los mecanismos de esta acción no están del todo claros. Parece que el ON induce la fosforilación de p53 en la serina 15, lo que no requiere ATP. El ON induce la retención nuclear de p53 y la apoptosis de células de neuroblastoma expuestas a radiación ionizante (21). Esto supondría que aumentando el ON se potenciaría la eficacia de la radioterapia en el tratamiento de ciertos tipos de cáncer. Y ya que se ha demostrado que p53 desempeña un papel primordial en respuesta a moléculas endógenas mutagénicas como el ON, y que células humanas expuestas al ON presentan acumulación de p53, es muy posible que para salvaguardar la integridad del ADN se reduzca la posibilidad del daño inducido por NO mediante la represión del enzima óxido nítrico sintasa 2 mediada por p53 (22).

El modelo experimental de ratón Sp53 presenta una mayor actividad antioxidante en los nervios ópticos, por lo que se le supone una mayor resistencia celular o un comportamiento celular potencialmente diferente ante la agresión oxidativa, especialmente en condiciones de isquemia-reperfusión o inflamación, e inducción de apoptosis dependiente de redox.

La proteína p53 es fundamental para entender la resistencia tisular a la formación de especies reactivas del oxígeno y a la acción de óxido nítrico en los nervios ópticos, en relación con procesos neurodegenerativos como la neuropatía óptica glaucomatosa o la degeneración macular asociada a la edad.

BIBLIOGRAFÍA

- Muñoz A. *Genes supresores de tumores y genes de reparación del DNA*. Madrid: Editorial Hélice; 1997; 205-239.
- Zavaglia D, Lin EH, Guidetti M, Pluquet O, Hianaut P, Favrot MC, et al. Poor intercellular transport and absence of enhanced antiproliferative activity alter non-viral gene transfer of VP22-P53 or P53-VP22 fusions into p53 null cell lines in vitro or in vivo. *J Gene Med* 2005; 7: 936-944.
- García-Cao I, Carcía-Cao M, Martín-Caballero J, Criado LK, Klatt P, Flores JM, et al. «Super p53» mice exhibit enhanced DNA damage response, are tumor resistant and age normally. *EMBO J* 2002; 21: 6225-6235.
- Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 1995; 267: 1445-1449.
- Odin L, Favrot M, Poujol D, Mitchot JP, Moingeon P, Tartaglia J, et al. Canarypox virus expressing wild type p53 for gene therapy in murine tumors mutated in p53. *Cancer Gene Ther* 2001; 8: 87-98.
- Boulton J. Ataxia telangiectasia gene mutations in leukaemia and lymphoma. *J Clin Pathol* 2001; 54: 512-516.
- Bates S, Voudsen KH. P53 in signaling checkpoint arrest or apoptosis. *Curr Opin Genet Dev* 1996; 6: 12-18.
- Lotem J, Peled-Kamar M, Groner Y, Sachs L. Cellular oxidative stress and the control of apoptosis by wild type p53, cytotoxic compounds and cytokines. *Proct Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 9166-9171.
- Raff MC. Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 1992; 356: 397-400.
- Guo L, Moss SE, Alexander RA, Ali RR, Fitzke FW, Cordeiro MF. Retinal ganglion cell apoptosis in glaucoma is related to intraocular pressure and IOP-induced effects on extracellular matrix. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; 46: 175-182.
- Kerrigan LA, Zack DJ, Quigley HA, Smith SD, Pease ME. TUNEL-positive ganglion cell in human primary open-angle glaucoma. *Arch Ophthalmol* 1997; 115: 1031-1035.
- Wu LY, Hinton DR, Guo L, Jiang S, Wang JT, Zeng A, et al. Microphthalmia resulting from MSX2-induced apoptosis in the optic vesicle. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44: 2404-2412.
- Strömmland K, Pinazo-Duran MD. Optic nerve hypoplasia: comparative effects in children and rats exposed to alcohol during pregnancy. *Teratology* 1994; 50: 100-111.
- Pinazo-Duran MD, Renau J, Guerri C, Strömmland K. Optic nerve hypoplasia in fetal alcohol syndrome: an update. *Eur J Ophthalmol* 1997; 7: 262-270.
- Strömmland K, Pinazo-Duran MD. Ophthalmic involvement in the fetal alcohol syndrome: clinical and animal model studies. *Alcohol Alcohol* 2002; 37: 2-8.
- Pinazo-Duran MD, Iborra JF, Pons S, Sevilla E, Gallego-Pinazo R, Muñoz A. Postnatal thyroid hormone supplementation rescues developmental abnormalities induced by congenital-neonatal hypothyroidism in the rat retina. *Ophthalmic Res* 2002; 37: 225-234.
- Melo P, Rodrigues LG, Pinazo-Duran MD, Tavares MA. Methamphetamine and lipid peroxidation in the rat retina. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2005; 73: 455-460.
- Pinazo-Duran MD, Cervera R, Pons S, Zanon VC, Gallego-Pinazo R, Guerri C. Mecanismos de expresión p53 en el nervio óptico de la rata. *Arch Soc Esp Oftalmol* 2005; 80: 99-104.
- Lowe SW, Bodis S, McClatchey, Remington L, Ruley HE, Fisher DE, et al. p53 status and the efficacy of cancer therapy in vivo. *Science* 1994; 266: 807-810.
- Neufeld AH, Sawada A, Becker B. Inhibition of nitric oxide synthase 2 by aminoguanidine provides neuroprotection of retinal ganglion cells in a rat model of chronic glaucoma. *Proct Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 9944-9948.
- Wang X, Zalcenstein A, Oren M. Nitric oxide promotes p53 nuclear retention and sensitizes neuroblastoma cells to apoptosis by ionizing radiation. *Cell Death Differ* 2003; 10: 468-476.
- Forrester K, Ambs S, Lupold SE, Kapust RB, Spillare EA, Weinberg WC, et al. Nitric oxide-induced p53 accumulation and regulation of inducible nitric oxide synthase expression by wild type p53. *Proct Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 2442-2447.