

Resúmenes de investigaciones presentadas en el XI Congreso nacional de la Asociación de Investigación en Visión y Oftalmología (AIVO) y III Reunión conjunta AIVO-BRAVO [Brazilian Research Association in Vision and Ophthalmology]

Buenos Aires, 20 y 21 de octubre de 2016

Abstracts of research papers presented at the 11th National meeting of the "Asociación de Investigación en Visión y Oftalmología" (AIVO) [Association for Research in Vision and Ophthalmology] and the III Joint meeting AIVO-BRAVO [Brazilian Research Association in Vision and Ophthalmology (BRAVO)]

Held in Buenos Aires, October 20th and 21st, 2016

Resumo das pesquisas apresentadas no XI Congresso nacional da Associação de Investigación en Visión y Oftalmología (AIVO) [Associação para Pesquisa em Visão e Oftalmologia] e no III Reunião conjunta AIVO-BRAVO [Brazilian Research Association in Vision and Ophthalmology (BRAVO)]

Que se levaram a cabo em Buenos Aires, 20 e 21 de outubro de 2016

Correspondencia

Dr. José Luna Pinto
Centro Privado de Ojos Romagosa y Fundación VER
Deán Funes 432
Córdoba, Argentina
fundacionver@gmail.com

Oftalmol Clin Exp (ISSN 1851-2658)
2016; 9(4): 117-169.

RESÚMENES / ABSTRACTS / RESUMOS

Melatonina: una herramienta terapéutica para la neuritis óptica

Aranda ML, González Fleitas MF, Dieguez HH, Chianelli MS, Keller Sarmiento MI, Dorfman D, Sande PH, Rosentein RE
Laboratorio de Neuroquímica Retiniana y Oftalmología Experimental, Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, CEFy-BO, UBA/CONICET.

Objetivos. En trabajos previos desarrollamos un nuevo modelo experimental de neuritis óptica primaria (NEO) a través de la microinyección de lipopolisacárido bacteriano (LPS) directamente en el nervio óptico, que reproduce características centrales de la NEO humana. El objetivo de este

trabajo fue evaluar el efecto del tratamiento con melatonina (MEL) sobre las alteraciones axogliales del nervio óptico y de la retina inducidas por NEO experimental.

Métodos. Se inyectaron 4,5 µg de LPS en un nervio óptico y vehículo en el nervio contralateral de ratas *Wistar* macho adultas. Un grupo de animales recibió el implante de un *pellet* subcutáneo de MEL (20 mg) un día antes o 4 días después de la inyección de LPS o vehículo. El efecto de la MEL se analizó a los 21 días postinyección de LPS en términos de: a) función de la vía visual (potenciales visuales evocados [VEP]), b) transporte anterógrado desde la retina a sus áreas de proyección central, c) reflejo pupilar consensual (RPC), d) microglía/macrófagos (por inmunorreactividad para Iba-1 y ED1), e) reactividad astrocitaria (por inmunorreactividad para la proteína glial fibrilar ácida, f) número de axones (azul de toluidina), g) desmielinización (*luxol fast blue*), y h) número de células ganglionares retinales (CGRs) (por inmunorreactividad para Brn3a).

Resultados. El LPS indujo una disminución significativa en la amplitud de los VEP y el RPC, un déficit en el transporte anterógrado, un aumento en la inmunorreactividad para Iba-1 y ED1 en el nervio óptico, astrocitosis, desmielinización y pérdida de CGR y de axones del nervio óptico. El pretratamiento con MEL previno significativamente todos estos parámetros ($P < 0.01$ vs. LPS). El posttratamiento con MEL evitó significativamente ($P < 0.01$ vs. LPS) la disminución de las amplitudes de los VEP y el RPC inducida por la inyección de LPS.

Conclusiones. En suma, estos resultados sugieren que la melatonina podría constituir una nueva estrategia terapéutica en el tratamiento de la neuritis óptica.

Melatonin: a therapeutic tool for optic neuritis

Objectives. As reported previously we have developed a new experimental model of primary optic neuritis (ON) by means of a microinjection of bacterial lipopolysaccharide (LPS) administered directly into the optic nerve that reproduces the core characteristics of human ON. The goal of this paper was to evaluate the effect of melatonin

(MEL) treatment on axoglia alteration of the optic nerve and retina induced by experimental ON.

Methods. 4.5 µg of LPS were injected into the optic nerves of adult male Wistar rats, while vehicle was injected into the contralateral optic nerve. A group of animals was implanted with a subcutaneous MEL pellet (20 mg) one day before or 4 days after the LPS or vehicle injection. The effect of MEL was analyzed 21 days after the LPS injection to evaluate: a) visual pathway function (visual evoked potentials [VEP]), b) anterograde transport from the retina to its central projection areas, c) consensual pupillary reflex (CPR), d) microglia/macrophages (by Iba1 and ED1 immunoreactivity), e) astrocyte reactivity (by glial fibrillary acidic protein), f) axon number (toluidine blue), g) demyelination (*luxol fast blue*), and h) number of retinal ganglion cells (RGCs) (by Brn3a immunoreactivity).

Results. LPS induced a significant reduction in VEP and CPR amplitudes, a deficit in anterograde transport, an increase in Iba-1 and ED1 immunoreactivity in the optic nerve, astrocitosis, demyelination and optic nerve RGC and axon loss. Pretreatment with MEL significantly prevented occurrence of all these effects ($P < 0.01$ vs. LPS). Post-treatment with MEL significantly ($P < 0.01$ vs. LPS) prevented the reduction in VEP and CPR amplitudes induced by LPS injection.

Conclusions. In short, these results suggest that melatonin might be a new therapeutic strategy in the treatment of optic neuritis.

Melatonina: uma ferramenta terapêutica para a neurite óptica

Objetivos. Em trabalhos prévios desenvolvemos um novo modelo experimental de neurite óptica primária (NEO) através da *microinjeção* de lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) diretamente no nervo óptico, que reproduz características centrais da NEO humana. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do tratamento com melatonina (MEL) sobre as alterações axogliais do nervo óptico e da retina induzidas por NEO experimental.

Métodos. Injetaram-se 4,5 µg de LPS em um nervo óptico e veículo no nervo contralateral de

ratos *Wistar* macho adultos. Um grupo de animais recebeu o implante de um *pellet* subcutâneo de MEL (20 mg) um dia antes ou 4 dias depois da injeção de LPS ou veículo. O efeito da MEL foi analisado aos 21 dias *pós-injeção* de LPS em termos de: a) função da via visual (potenciais visuais evocados [VEP]), b) transporte anterógrado desde a retina a suas áreas de projeção central, c) reflexo pupilar consensual (RPC), d) micróglia/macrófagos (por imunorreatividade para Iba-1 e ED1), e) reatividade astrocitária (por imunorreatividade para a proteína glial fibrilar ácida), f) número de axônios (azul de toluidina), g) desmielinização (*luxol fast blue*), e h) número de células ganglionares retinais (CGRs) (por imunorreatividade para Brn3a).

Resultados. O LPS induziu uma diminuição significativa na amplitude dos VEP e o RPC, um déficit no transporte anterógrado, um crescimento na imunorreatividade para Iba-1 e ED1 no nervo óptico, astrocitose, desmielinização e perda de CGR e de axônios do nervo óptico. O pré-tratamiento com MEL evitou significativamente todos esses parâmetros ($P < 0.01$ vs. LPS). O pós-tratamiento com MEL preveniu significativamente ($P < 0.01$ vs. LPS) a diminuição das amplitudes dos VEP e a RPC induzida pela injeção de LPS.

Conclusões. Em suma, estes resultados sugerem que a melatonina poderia constituir uma nova estratégia terapêutica no tratamento da neurite óptica.

Vías de señalización involucradas en la respuesta del epitelio pigmentario a altas concentraciones de glucosa: implicancias en la retinopatía diabética

Tenconi PE, Salvador GA, Giusto NM, Mateos MV.
 Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca (INIBIBB),
 Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)
 y Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia (DBByF), Univer-
 sidad Nacional del Sur (UNS), 8000 Bahía Blanca, Argentina.
 mvmateos@criba.edu.ar

Objetivos. Caracterizar nuevos mecanismos moleculares involucrados en la respuesta de las células del epitelio pigmentario de la retina (EPR) sometidas a un modelo de retinopatía diabética (RD) *in vitro*. En particular estudiamos

el rol de la vía de la fosfolipasa D (PLD) en las células del EPR expuestas a altas concentraciones de glucosa.

Métodos. Como modelo experimental se utilizaron células de EPR humanas (ARPE-19 y D407) incubadas en presencia de glucosa 5,5 mM (situación control, normoglucemia o NG) o de glucosa 16,5 y 33 mM (condiciones de alta glucosa o HG) por 4 y 72 horas. La viabilidad celular se evaluó midiendo la funcionalidad mitocondrial por el ensayo de reducción de MTT. Se realizaron ensayos de *Western blot* (WB), de inmunocitoquímica y la actividad PLD se evaluó midiendo la generación de fosfatidiletanol radiomarcado en células premarcadas con ácido oleico tritiado. Se utilizaron inhibidores farmacológicos selectivos de PLD1 (EVJ 0,15 μ M), de PLD2 (APV 0,5 μ M), de la vía MEK/ERK (U0126 10 μ M) y de la ciclooxigenasa-2 (COX-2, Celecoxib 10 μ M).

Resultados. Luego de 72 horas de exposición a ambas concentraciones de HG la viabilidad celular se redujo un 30% y la generación de especies reactivas de oxígeno se incrementó un 500% con respecto a la condición de NG, lo que se correlacionó con una reducción en la expresión de la enzima peroxirredoxina. Por otra parte, la exposición a HG por 4 horas indujo la activación de ERK y la translocación al núcleo de la subunidad p65 del factor de transcripción NF κ B. Además, en las células expuestas a HG por 4 horas la actividad PLD se incrementó en un 80% con respecto del control. La inhibición farmacológica de PLD1 y PLD2 inhibió la activación de ERK y la localización nuclear de NF κ B. Asimismo, la inhibición de PLD1, PLD2, ERK y COX-2 contrarrestó parcialmente la pérdida de viabilidad celular inducida por HG.

Conclusiones. Nuestros resultados demuestran que la activación secuencial de PLD1 y PLD2, y sus efectores corriente abajo ERK y NF κ B median el daño inducido por HG en las células del EPR. Estos hallazgos postulan a estas vías de señalización como potenciales blancos terapéuticos para el tratamiento de enfermedades inflamatorias de la retina, tales como la RD.

Signaling pathways involved in pigment epithelium response to high glucose concentrations: implications in diabetic retinopathy

Objectives. To characterize new molecular mechanisms involved in the response of retinal pigment epithelium cells (RPE) subjected to an *in vitro* diabetic retinopathy (DR) model, with a focus on the study of the role of the phospholipase D pathway in RPE cells exposed to high glucose concentrations.

Methods. Human RPE cells (ARPE-19 and D407) incubated in the presence of 5.5 mM glucose (normal controls, normoglycemia or NG) or of 16.5 and 33 mM glucose (high glucose conditions or HG) for 4 and 72 hours were used as an experimental model. Cell viability was evaluated by measuring mitochondrial functionality using the MTT assay. Western blot (WB) and immunocytochemistry assays were performed, and PLD activity was evaluated by measuring radiolabeled phosphatidylethanol generation in cells pre-labeled with tritiated oleic acid. Selective inhibitors of PLD1 (EVJ: 0.15 μ M), of PLD2 (APV: 0.5 μ M), of the MEK/ERK pathway (U0126 10 μ M) and of cyclooxygenase-2 (COX-2, Celecoxib 10 μ M) were used.

Results. After 72-h exposure to both HG concentrations, cell viability decreased by 30% and generation of oxygen-reactive species rose by 500% vs. the NG condition, and this was correlated with a reduction in the expression of the peroxiredoxin enzyme. On the other hand, exposure to HG for 4 hours induced ERK activation and nuclear translocation of the NF κ B p65 subunit. Furthermore, in those cells exposed to 4-h HG, PLD activity increased by 80% vs. control. Pharmacological PLD1 and PLD2 inhibition suppressed activation of ERK and nuclear localization of NF κ B. Likewise, PLD1, PLD2, ERK and COX-2 inhibition partially counteracted the HG-induced cell viability loss.

Conclusions. Our results demonstrate that sequential activation of PLD1 and PLD2, as well as of their downstream effectors, ERK and NF κ B, mediates HG-induced damage to RPE cells. These findings suggest that these signaling pathways might be potential therapeutic targets for the

treatment of retinal inflammatory diseases such as DR.

Vias de sinalização envolvidas na resposta do epitélio pigmentar a altas concentrações de glicose: implicações para a retinopatia diabética

Objetivos. Caracterizar novos mecanismos moleculares envolvidos na resposta das células do epitélio pigmentário da retina (EPR) submetidas a um modelo de retinopatia diabética (RD) *in vitro*. Em particular estudamos o rol da via da fosfolipase D (PLD) nas células do EPR expostas a altas concentrações de glicose.

Métodos. Como modelo experimental foram utilizadas células de EPR humanas (ARPE-19 y D407) incubadas em presença de glicose 5,5 mM (situação controle, normoglicêmica o NG) ou de glicose 16,5 e 33 mM (condições de alta glicose o HG) por 4 e 72 horas. A viabilidade celular foi avaliada medindo a funcionalidade mitocondrial pelo ensaio de redução de MTT. Realizaram-se ensaios de *Western blot* (WB), de imunocitoquímica e a atividade PLD foi avaliada medindo a geração de fosfatidiletanol radiomarcado em células pré-marcadas com ácido oleico tritiado. Utilizaram-se inibidores farmacológicos seletivos de PLD1 (EVJ 0,15 μ M), de PLD2 (APV 0,5 μ M), da via MEK/ERK (U0126 10 μ M) e da ciclooxigenase-2 (COX-2, Celecoxib 10 μ M).

Resultados. Após 72 horas de exposição a ambas as concentrações de HG a viabilidade celular reduziu 30% e a geração de espécies reativas de oxigênio aumentou 500% respeito à condição de NG, o que correlacionou com uma redução na expressão da enzima peroxirredoxina. De outra parte, a exposição a HG por 4 horas induziu a ativação de ERK e a translocação ao núcleo da subunidade p65 do fator de transcrição NF κ B. Além disso, nas células expostas a HG por 4 horas atividade PLD aumentaram 80% em relação ao controle. A inibição farmacológica de PLD1 e PLD2 inibiu a ativação de ERK e a localização nuclear de NF κ B. Além disso, a inibição de PLD1, PLD2, ERK e COX-2 compensou parcialmente a perda de viabilidade celular induzida por HG.

Conclusões. Nossos resultados demonstram que a ativação sequencial de PLD1 e PLD2, e seus efetores corrente abaixo ERK e NFκB medeiam o dano induzido por HG nas células do EPR. Esses achados postulam estas vias de sinalização como potenciais alvos terapêuticos para o tratamento de doenças inflamatórias da retina, tais como a RD.

Vías involucradas en la migración de las células gliales de Müller: ¿un rol para la ceramida-1- fosfato endógena?

Vera M., Prado Spalm FH, Simón MV, Politi LE, Rotstein NP. Instituto de Investigaciones Bioquímicas, Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional del Sur-CONICET, Bahía Blanca, Argentina. marceverita@gmail.com

Objetivos. Múltiples estímulos patogénicos provocan una respuesta reactiva de las células gliales de Müller (CGM) y promueven su capacidad migratoria, contribuyendo así a la etiología de diversas patologías proliferativas de la retina. Los mecanismos y mediadores que participan en esta migración son objeto de intenso estudio. Hemos establecido recientemente que un esfingolípido —la esfingosina-1-fosfato (S1P)— estimula la migración de las CGM de retina in vitro. Estudiamos ahora qué vías intracelulares participan en dicha migración y si otro esfingolípido, la ceramida-1-fosfato (C1P) es capaz de estimularla.

Métodos. Se prepararon cultivos gliales puros de retina de rata de 3 días, que se incubaron en medio con suero y se replicaron e incubaron hasta ser confluentes. Se analizó la migración glial por la “técnica de la herida”. Se investigó la participación de las vías de PI3K, ERK/MAPK, p38 MAPK y Jun quinasa N terminal (JNK), tratando a los cultivos con los inhibidores LY294002, U0126, SB203580 y SP600125 respectivamente, una vez realizada la herida. Se evaluó el efecto del agregado exógeno de C1P y el de inhibir su síntesis endógena con NVP231 sobre la migración. Se determinó por PCR la presencia de la ceramida quinasa (CerK), enzima involucrada en la síntesis de C1P.

Resultados. El tratamiento con un inhibidor de la vía de la PI3K inhibió completamente la

migración glial, mientras que inhibidores de las vías de Erk/MAPK y p38MAPK no la afectaron. En contraste, la inhibición de la vía de JNK disminuyó marcadamente la migración glial. Las CGM expresan CerK y la inhibición de esta enzima, bloqueando la síntesis endógena de C1P frenó totalmente la migración glial. El agregado exógeno de C1P aumentó esta migración, aunque en forma no significativa.

Conclusiones. Estos resultados sugieren que las vías de la PI3K y de la JNK activan la migración de las CGM y que estas células sintetizan C1P que actúa como señal para activar su migración.

Pathways involved in Müller glial cell migration: a role for endogenous ceramide-1-phosphate?

Objectives. There are multiple pathogenic stimuli involved in the triggering of a reactive response of Müller glial cells (MGCs) and in the promotion of their migratory ability, thus contributing to the etiology of many proliferative retinal disorders. The mechanisms and mediators having a role in this migration have been studied extensively. We have recently established that a sphingolipid —sphingosine 1-phosphate (S1P)— stimulated in vitro retinal MGC migration. Our current goal is to identify the intracellular pathways involved in this migration and to study whether there is another sphingolipid, ceramide 1-phosphate (C1P), with the ability of stimulating it.

Methods. Pure rat retinal glial cultures from 3-day-old rats were prepared and incubated in a serum medium. These were replicated and incubated until they became confluent. Glial migration was analyzed using the “wound technique”. Involvement of PI3K, ERK/MAPK, p38 MAPK and c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathways by treating cultures with LY294002, U0126, SB203580 and SP600125 inhibitors, respectively, once the wound was made, was investigated. Effect on migration of addition of exogenous C1P and of inhibition of its endogenous synthesis with NVP231 was evaluated. The presence of ceramide kinase (CerK), an enzyme involved in C1P synthesis was detected by PCR.

Results. Treatment with a PI3K pathway inhibitor fully suppressed glial migration, while Erk/MAPK and p38MAPK pathway inhibitors failed to affect it. In contrast, JNK pathway inhibition reduced glial migration markedly. MGCs express CerK, and inhibition of this enzyme, blocking C1P endogenous synthesis, stopped glial migration completely. Exogenous addition of C1P increased this migration, though not significantly.

Conclusions. Our results suggest that PI3K and JNK pathways activate MGC migration and that these cells synthesize C1P, which acts as a signal to activate their migration.

Vias envolvidas na migração das células gliais de Müller: uma função para a ceramida-1- fosfato endógena?

Objetivos. Múltiplos estímulos patogênicos provocam uma resposta reativa das células gliais de Müller (CGM) e promovem sua capacidade migratória, contribuindo assim à etiologia de diversas patologias proliferativas da retina. Os mecanismos e mediadores que participam em esta migração são objeto de intenso estudo. Temos estabelecido recentemente que um esfingolípido —a esfingosina-1-fosfato (S1P)— estimula a migração das CGM de retina in vitro. Estudamos agora quais as vias intracelulares que participam da migração e se outro esfingolípido, a ceramida-1-fosfato (C1P) pode estimulá-la.

Métodos. Prepararam-se culturas gliais puros de retina de rato de três dias, incubados em médio com soro e repicaram e incubaram até ser confluentes. Analisou-se a migração glial pela “técnica da ferida”. Foi pesquisada a participação das vias de PI3K, ERK/MAPK, p38 MAPK e Jun quinase N terminal (JNK), tratando as culturas com os inibidores LY294002, U0126, SB203580 e SP600125 respectivamente, após realizada a ferida. Avaliou-se o efeito do agregado exógeno de C1P e a inibição de sua síntese endógena com NVP231 sobre a migração. Determinou-se por PCR a presença da ceramida quinase (CerK), enzima envolvida na síntese de C1P.

Resultados. O tratamento com um inibidor da via da PI3K inibiu completamente a migração glial, enquanto inibidores das vias de Erk/

MAPK e p38MAPK não afetaram a migração. Em contraste, a inibição da via de JNK diminuiu marcadamente a migração glial. As CGM expressam CerK e a inibição desta enzima, bloqueando a síntese endógena de C1P parou totalmente a migração glial. O agregado exógeno de C1P acrescentou essa migração, embora em forma não significativa.

Conclusões. Estes resultados sugerem que as vias da PI3K e da JNK ativam a migração das CGM e que estas células sintetizam C1P que atua como sinal para ativar sua migração.

La ceramida promueve la muerte de los fotorreceptores a través de una vía caspasa independiente

Prado Spalm FH, Vera MS, Politi LE, Rotstein NP.
Instituto de Investigaciones Bioquímicas, Departamento Biología, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional del Sur-CONICET, Bahía Blanca, Argentina.
fpradospalm@inibibb-conicet.gob.ar

Objetivos. La muerte por apoptosis de los fotorreceptores (FR) es un factor común en muchas enfermedades neurodegenerativas de la retina. Investigar los mecanismos y mediadores moleculares de esa muerte resulta un adecuado enfoque en la búsqueda de futuros tratamientos. Nuestro laboratorio demostró que la ceramida (Cer) induce la muerte de FR en cultivo y que el ácido docosahexaenoico (DHA) protege frente a tal daño. Ahora investigamos los mecanismos moleculares que median la inducción de muerte por Cer de los FR en cultivo.

Métodos. Los cultivos neuronales puros de retina de rata se trataron con o sin 10 μ M C2-ceramida (C2-Cer). Se evaluaron distintos marcadores y vías de la apoptosis. Se analizó la integridad nuclear con la sonda DAPI, la fragmentación del DNA mediante ensayo de TUNEL, la preservación del potencial de membrana mitocondrial con Mitotracker, y la viabilidad celular por ensayo de MTT. Se investigó el efecto de C2-Cer sobre la vía de Erk/MAPK por *Western blot*. Para analizar si Cer activaba a las caspasas se evaluó la activación de caspasa-3 por inmunocitoquímica y se pretrataron los cultivos con z-vad-fmk, un pan inibidor de caspasas. Para investigar

la participación de catepsinas y/o calpaínas se utilizó ALLN, un pan inhibidor de ambas proteasas.

Resultados. La C2-Cer indujo la muerte de los FR, incrementando los núcleos picnóticos del 10% al 50%. El ensayo de TUNEL no mostró que C2-Cer aumentara la fragmentación internucleosomal del DNA en los FR aún después de 15 horas. La C2-Cer indujo una rápida disminución de P-Erk, a los 30 y 60 minutos de su agregado. La disminución de un 40% en la viabilidad (MTT) y de los FR que preservaban el potencial de membrana mitocondrial sugirió que C2Cer afectaría a las mitocondrias, aunque sin desencadenar la activación de las caspasas, ya que no se observaron FR caspasa-3 clivada positivos y el agregado de z-vad-fmk no frenó la muerte. Por su parte, la preincubación con ALLN disminuyó significativamente esa muerte sugiriendo un rol clave de las catepsinas y/o calpaínas.

Conclusiones. la Cer induciría la muerte por apoptosis de los fotorreceptores a través de un mecanismo caspasa-independiente que involucraría a catepsinas y/o calpaínas.

Ceramide promotes photoreceptor death via a caspase-independent pathway

Objectives. Photoreceptor (PR) death due to apoptosis is a common factor in many neurodegenerative retinal diseases. Investigation of the molecular mechanisms and mediators of this death is an adequate approach in the search for future therapies. Our laboratory has demonstrated that ceramide (Cer) induces PR death in cultures, and that docosahexaenoic acid (DHA) has a protective effect against this damage. Now we are investigating the molecular mechanisms mediating Cer-induced death of cultured PRs.

Methods. Pure neuronal retinal cultures from rats were treated with or without 10 μ M C2-ceramide (C2-Cer). Different markers and apoptosis pathways were evaluated. Nuclear integrity was analyzed with the DAPI probe, DNA fragmentation, with TUNEL assay, mitochondrial membrane potential preservation, with MitoTracker and cell viability, with MTT assay. Western blotting was used to investigate the

effect of C2-Cer on the ERK/MAPK pathway. To analyze whether Cer activated caspases, caspase-3 activation was evaluated by immunocytochemistry and cultures were pretreated with the pan-caspase inhibitor z-vad-fmk. Involvement of the proteases cathepsin and/or calpain was investigated by using the pan-cathepsin/calpain inhibitor ALLN.

Results. C2-Cer induced PR death, with an increase in pyknotic nuclei from 10% to 50%. TUNEL assay failed to evidence a C2-Cer-induced increase in internucleosomal DNA fragmentation in PRs even after 15 hours. C2-Cer induced a rapid P-ERK decrease 30 and 60 minutes after its addition. The 40% reduction in cell viability (MTT) and of PRs that preserved the mitochondrial membrane potential suggested that C2-Cer might affect mitochondria, but without triggering caspase activation, since no cleaved caspase-3-positive photoreceptors were observed, and z-vad-fmk addition failed to stop death. On the other hand, preincubation with ALLN significantly reduced this death, thus suggesting a key role of cathepsins and/or calpains.

Conclusions. Cer might induce apoptotic photoreceptor death via a caspase-independent mechanism suggested to involve cathepsins and/or calpains.

A ceramida promove a morte dos fotorreceptores através de uma via caspase independente

Objetivos. A morte por apoptose dos fotorreceptores (FR) é um fator comum em muitas doenças neurodegenerativas da retina. Pesquisar os mecanismos e mediadores moleculares dessa morte resulta um adequado enfoque na busca de futuros tratamentos. Nosso laboratório demonstrou que a ceramida (Cer) induz a morte de FR em cultura e que o ácido docosahexaenoico (DHA) protege ante esse dano. Agora pesquisamos os mecanismos moleculares que medeiam a indução de morte por Cer dos FR em cultura.

Métodos. As culturas neuronais puras de retina de rato foram tratadas com ou sem 10 μ M C2-ceramida (C2-Cer). Avaliaram-se distintos marcadores e vias de apoptose. Analisou-se a integridade nuclear com a sonda DAPI, a fragmenta-

ção do DNA mediante ensaio de TUNEL, a preservação do potencial de membrana mitocondrial com Mitotracker, e a viabilidade celular por ensaio de MTT. Pesquisou-se o efeito de C2-Cer sobre a via de Erk/MAPK por *Western blot*. Para analisar se Cer ativava as caspases se avaliou a ativação de caspase-3 por imunocitoquímica e as culturas foram pré-tratadas com z-vad-fmk, um inibidor pan-caspases. Para pesquisar a participação de catepsinas e/ou calpaínas se utilizou ALLN, um pan-inibidor de ambas as proteases.

Resultados. A C2-Cer induziu a morte dos FR, incrementando os núcleos picnóticos de 10% para 50%. O ensaio de TUNEL não mostrou que C2-Cer aumentasse a *fragmentação* internucleosomal do DNA nos FR ainda depois de 15 horas. A C2-Cer induziu uma rápida diminuição de P-Erk, aos 30 e 60 minutos de agregada. A diminuição de 40% na viabilidade (MTT) e dos FR que preservavam o potencial de membrana mitocondrial sugeriu que C2Cer afetaria as mitocôndrias, embora sem desencadear a ativação das caspases, já que não se observaram FR caspase-3 clivada positivos e o agregado de z-vad-fmk não parou a morte. Por seu lado, a pré-incubação com ALLN diminuiu significativamente essa morte sugerindo um papel chave das catepsinas e/ou calpaínas.

Conclusões. A Cer induziria a morte por apoptose dos fotorreceptores através de um mecanismo caspase-independente que envolveria catepsinas e/ou calpaínas.

Sensibilidad al contraste mesópica en pacientes con glaucoma

Issolio L^{a-b}, Tripolone C^a, Silva B^b, Paz Filgueira C^b, Pérez D^c, Barrionuevo P^b

^a Departamento de Luminotecnia, Luz y Visión, Facultad de Ciencias Exactas y Tecnología, Universidad Nacional de Tucumán, San Miguel de Tucumán, Argentina.

^b Instituto de Investigación en Luz, Ambiente y Visión, Consejo Nacional de Investigaciones Científica y Técnicas (CONICET) y Universidad Nacional de Tucumán.

^c Cátedra de Oftalmología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Tucumán.

lissolio@herrera.unt.edu.ar

El glaucoma es una de las principales causas de ceguera irreversible en el mundo. Considerando que al menos 30% de células ganglionares de la

retina pueden verse afectadas antes de que el sujeto presente signos evidentes de la enfermedad, las herramientas disponibles para su detección temprana aún tienen poca sensibilidad, lo que nos anima a explorar nuevas alternativas. En el rango mesópico trabajan conjuntamente los dos tipos de fotorreceptores clásicos: conos y bastones, y se sugirió que el glaucoma deteriora tempranamente el camino de bastones (Cuenca *et al.*, *Exp Eye Res*, 2010). El objetivo de este trabajo es estudiar la sensibilidad al contraste (SC) en el rango mesópico en pacientes con glaucoma.

Se hicieron mediciones de SC con un equipo informatizado FVC100 (Tecnovinc) en el rango mesópico de adaptación (0,5 cd/m²). Las medidas fueron monoculares y se estimuló la zona foveal (*on-axis*) para frecuencias espaciales de 2 y 4 c/g y extrafoveal (*off-axis*) para 2 c/g. El grupo de pacientes estuvo formado por 16 casos de glaucoma en un rango de 31 a 53 años y se excluyeron aquellos ojos con relación copa disco (CDR) mayor a 0,7. Además se hicieron mediciones en las mismas condiciones en un grupo control compuesto por 15 sujetos (visión normal o corregida y sin patologías visuales) del mismo rango de edad (28-53).

Los resultados indican reducciones significativas en la sensibilidad al contraste del grupo glaucomatoso respecto del control para todas las condiciones evaluadas: 4 c/g *on-axis* (t=5,46; p<0,0001); 2 c/g *on-axis* (t=-6,39; p<0,0001); y 2 c/g *off-axis* (t=3,18; p<0,01), indicando que las diferencias en las medidas foveales son mayores a las obtenidas extrafovealmente, al contrario de lo esperado.

Este primer estudio indica que la SC mesópica es afectada fuertemente en pacientes con glaucoma. Un estudio basado en pacientes con sospecha de glaucoma podría confirmar la mayor sensibilidad de las medidas extrafoveales para la detección temprana de esta neuropatía.

Mesopic contrast sensitivity in glaucoma patients

Glaucoma is one of the leading causes of irreversible blindness in the world. Given the fact that at least 30% of retinal ganglion cells may be affected

before the individual has evident signs of the disease, tools available for its early detection still have low sensitivity, thus encouraging us to explore new alternatives. The two classic photoreceptor types, rods and cones, work jointly in the mesopic range, and glaucoma has been suggested to early degenerate rod pathways (Cuenca *et al.*, *Exp Eye Res*, 2010). The goal of this study was to investigate contrast sensitivity (CS) in the mesopic range in patients with glaucoma.

CS measurements were made with the computerized device FVC100 (Tecnovinc) in the mesopic adaptation range (0.5 cd/m²). Measurements were monocular, the (on axis) foveal area was stimulated for spatial frequencies of 2 and 4 cycles/degree and the (off axis) extrafoveal area, for 2 c/d. The group of patients studied included 16 glaucoma cases with a range of 31 to 53 years of age, and those eyes with a cup-disc ratio (CDR) over 0.7 were excluded. Furthermore, measurements were made under the same conditions in a control group including 15 individuals (with normal or corrected visual acuity and no visual diseases) of the same age-range (28-53).

Results evidence significant reductions in the contrast sensitivity of the glaucoma group vs. the control group for all the conditions assessed: 4 c/d on axis ($t=5.46$; $p<0.0001$), 2 c/d on axis ($t=-6.39$, $p<0.0001$), and 2 c/d off-axis ($t=3.18$, $p<0.01$), thus indicating that the differences in foveal measurements are greater than those obtained in the extrafoveal area, conversely to what was expected.

This first study evidences that mesopic CS is strongly affected in patients with glaucoma. A study based on patients with suspected glaucoma might confirm the higher sensitivity of extrafoveal measurements for early detection of this neuropathy.

Sensibilidade ao contraste mesópico em pacientes com glaucoma

O glaucoma é uma das principais causas de cegueira irreversível no mundo. Considerando que no mínimo 30% de células ganglionares da retina podem ser afetadas antes que o sujeito apresente sinais evidentes da doença, as ferramentas disponíveis para sua detecção precoce ainda têm pouca

sensibilidade, o que nos anima para explorar novas alternativas. Na faixa mesópica trabalham conjuntamente os dois tipos de fotorreceptores clássicos: *cones e bastões*, e foi sugerido que o glaucoma deteriora precocemente o caminho de bastões (Cuenca *et al.*, *Exp Eye Res*, 2010). O objetivo deste trabalho é estudar a sensibilidade ao contraste (SC) na faixa mesópica em pacientes com glaucoma.

Fizeram-se medições de SC com uma equipe informatizada FVC100 (Tecnovinc) na faixa mesópica de adaptação (0,5 cd/m²). As medidas foram monoculares e se estimulou a zona foveal (*on-axis*) para frequências espaciais de 2 e 4 c/g e extrafoveal (*off-axis*) para 2 c/g. O grupo de pacientes foi formado por 16 casos de glaucoma em uma faixa de 31 a 53 anos de idade e foram excluídos aqueles olhos com relação copo disco (CDR) maior a 0,7. Além disso, medições foram feitas, nas mesmas condições, em um grupo controle composto por 15 sujeitos (visão normal ou corrigida e sem patologias visuais) na mesma faixa de idade (28-53).

Os resultados indicam reduções significativas na sensibilidade ao contraste do grupo glaucomatoso a respeito do controle para todas as condições avaliadas: 4 c/g *on-axis* ($t=5,46$; $p<0,0001$); 2 c/g *on-axis* ($t=-6,39$; $p<0,0001$); e 2 c/g *off-axis* ($t=3,18$; $p<0,01$), indicando que as diferenças nas medidas foveais são maiores às obtidas extrafovealmente, a contrário do esperado.

Este primeiro estudo indica que a SC mesópica é afetada fortemente em pacientes com glaucoma. Um estudo baseado em pacientes com suspeita de glaucoma poderia confirmar a maior sensibilidade das medidas extrafoveais para a detecção precoce desta neuropatia.

Cianotoxinas presentes en agua dulce inducen degeneración sobre neuronas de retina de rata en cultivo

Dibo MJ, Jaskolowsky Q, Volonté YA, Soto TB, Ayala Peña VB, German OL, Rotstein NP, Politi LE.

Instituto de Investigaciones Bioquímicas, Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional del Sur-CONICET, Bahía Blanca, Argentina

mdibo@inibibb-conicet.gob.ar

Objetivos. Los dos géneros más comunes de cianobacterias presentes en los cuerpos de agua

dulce, incluyendo los usados para consumo humano, son *Anabaena* y *Microcystis*. Debido al aumento de la temperatura terrestre y a los fenómenos de eutrofización crecientes, estas cianobacterias producen frecuentes “floraciones” en las que pueden liberar toxinas como microcistinas (MC) y anatoxinas (At). Esas toxinas causan graves daños hepáticos y neurológicos, respectivamente, por lo que representan un potencial riesgo para la salud. Los efectos de la exposición directa de neuronas de retina a estas toxinas no han sido establecidos. El objetivo de este trabajo es evaluar si estas toxinas inducen alteraciones neurodegenerativas en neuronas de retina *in vitro*.

Métodos. Cultivos neuronales puros de retina de rata fueron incubados sin (control) o con At-a (10 nM) o MC (100 nM), agregadas a día 1. Al cabo de cuatro días se evaluaron la supervivencia, la integridad nuclear y la apoptosis con la sondas yoduro de propidio, DAPI y por el ensayo de TUNEL, respectivamente. La preservación del potencial de membrana mitocondrial fue evaluada con Mitotracker, la integridad del citoesqueleto con faloidina y el crecimiento axonal con marcadores para tubulina.

Resultados. El tratamiento con At-a o MC aumentó un 30% y 25% respectivamente, el porcentaje de núcleos fragmentados o picnóticos respecto de los controles, mientras que el porcentaje de neuronas TUNEL-positivas (apoptóticas) aumentó significativamente de 20% en controles a alrededor de 40% en cultivos tratados con cianotoxinas. Este aumento fue acompañado por una disminución en el porcentaje de neuronas que preservaron el potencial de membrana en sus mitocondrias. Ambas toxinas promovieron la desorganización del citoesqueleto de actina y la pérdida de la integridad axonal. La At-a tuvo efectos neurotóxicos más pronunciados que la MC.

Conclusiones. Ambas cianotoxinas indujeron daños degenerativos significativos en neuronas de retina, promoviendo la desorganización del citoesqueleto, alteraciones mitocondriales y muerte por apoptosis. Esto sugiere que aún en muy bajas concentraciones podrían ser deletéreas para las neuronas de retina, hallazgo que

debería considerarse al momento de diseñar programas destinados a minimizar el impacto de las frecuentes floraciones de estas cianobacterias sobre la salud humana.

Cyanotoxins present in fresh water induce retinal neuron degeneration in cultured rats

Objectives. The two most common cyanobacteria genders found in fresh water bodies, including those used for human consumption, are *Anabaena* and *Microcystis*. Due to the rise in earth temperatures and to the increasing eutrophication phenomena, these cyanobacteria usually bloom, with the consequent possible release of microcystins (MC) and anatoxins (At). These toxins cause great liver and neurologic damage, respectively, thereby representing a potential health risk. The effects of direct retinal neuron exposure to these toxins are still not established. The purpose of this paper is to evaluate whether these toxins induce neurodegenerative changes in retinal neurons *in vivo*.

Methods. Pure neuronal cultures of rat retinas were incubated without (control) or with At-a (10 nM) or MC (100 nM) added on day 1. After four days, survival, nuclear integrity and apoptosis were evaluated using propidium iodide and DAPI probes and the TUNEL assay, respectively. Mitochondrial membrane potential preservation was evaluated with MitoTracker, cytoskeleton integrity, with phalloidin, and axonal growth, with tubulin markers.

Results. Treatment with At-a or MC increased by 30% and 25%, the percentage of fragmented or pyknotic nuclei, respectively, vs. controls, while the percentage of TUNEL-positive (apoptotic) neurons increased significantly from 20% in controls to near 40% in cultures treated with cyanotoxins. This increase was associated with a decrease in the percentage of neurons that preserved their mitochondrial membrane potential. Both toxins induced actin cytoskeleton disorganization and axonal integrity loss. At-a had more marked neurotoxic effects than MC.

Conclusions. Both cyanotoxins induced significant degenerative damage in retinal neurons, by

promoting cytoskeleton disorganization, mitochondrial changes and apoptotic death. This suggests that even at very low concentrations they might be deleterious for retinal neurons, a finding that should be considered when designing programs aimed at minimizing the impact of frequent blooming of these cyanobacteria on human health.

Cianotoxinas presentes em água doce induzem degeneração sobre neurônios de retina de rato em cultura

Objetivos. Os dois gêneros mais comuns de cianobactérias presentes nos corpos de água doce, incluindo os usados para consumo humano, são *Anabaena* e *Microcystis*. Devido ao aumento da temperatura terrestre e aos fenômenos de eutrofização crescentes, essas cianobactérias produzem frequentes “florações” nas que podem liberar toxinas como microcistinas (MC) e anatoxinas (At). Essas toxinas causam graves danos hepáticos e neurológicos, respectivamente, pelo que representam um potencial risco para a saúde. Os efeitos da exposição direta de neurônios de retina a estas toxinas não têm sido estabelecidos. O objetivo deste trabalho é avaliar se essas toxinas induzem alterações neurodegenerativas em neurônios de retina *in vitro*.

Métodos. Culturas neuronais puras de retina de rato foram incubadas sem (controle) ou com At-a (10 nM) ou MC (100 nM), adicionadas a dia 1. Logo de quatro dias se avaliaram a sobrevivência, a integridade nuclear e a apoptose com sondas iodeto de propídio, DAPI e pelo ensaio de TUNEL, respectivamente. A preservação do potencial de membrana mitocondrial foi avaliada com Mitotracker, a integridade do citoesqueleto com faloidina e o crescimento axonal com marcadores para tubulina.

Resultados. O tratamento com At-a o MC aumentou 30% e 25% respectivamente, a porcentagem de núcleos fragmentados ou picnóticos a respeito dos controles, enquanto a porcentagem de neurônios TUNEL-positivos (apoptóticos) aumentou significativamente de 20% em controles para cerca de 40% em culturas tratadas com cianotoxinas. Este crescimento foi acompa-

nhado por uma diminuição na porcentagem de neurônios que preservaram o potencial de membrana em suas mitocôndrias. Ambas as toxinas promoveram a desorganização do citoesqueleto de actina e a perda da integridade axonal. A At-a teve efeitos neurotóxicos mais pronunciados que a MC.

Conclusões. Ambas as cianotoxinas induziram danos degenerativos significativos em neurônios da retina, promovendo a desorganização do citoesqueleto, alterações mitocondriais e morte por apoptose. Isso sugere que ainda em concentrações muito baixas poderiam ser deletérias para os neurônios de retina, achado que deveria ser considerado ao momento de desenhar programas destinados a minimizar o impacto das frequentes florações destas cianobactérias sobre a saúde humana.

Efecto terapéutico de la minociclina en un modelo de glaucoma experimental

González Fleitas F, Bordone MP, Aranda ML, Chianelli M, Keller Sarmiento MI, Diéguez H, Sande P, Dorfman D, Rosenstein RE.

Laboratorio de Neuroquímica Retiniana y Oftalmología Experimental, Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, UBA, CEFyBO-CONICET.
florf_88@hotmail.com

Objetivos. El glaucoma, una de las principales causas de ceguera, involucra la muerte de las células ganglionares retinales (CGR) y daño en el nervio óptico (NO). En este trabajo, analizamos el efecto de la minociclina sobre las alteraciones axogliales tempranas del NO en un modelo de glaucoma experimental inducido por inyecciones semanales de condroitín sulfato (CS).

Métodos. En ratas *Wistar* macho adultas se inyectó semanalmente vehículo o CS en cámara anterior durante 6 o 15 semanas. Se analizó el número de CGR (inmunorreactividad para Brn3a), el transporte anterógrado de la subunidad B de la toxina colérica (CTB) y marcadores axogliales en el NO (microglía: Iba-1 y ED1; astrocitos: proteína glial fibrilar ácida [GFAP] y axones: neurofilamento fosforilado [pNFH]) por inmunohistoquímica. La participación de la microglía se evaluó a través de un tratamiento

diario con minociclina (30 mg/kg, i. p.) durante 2 semanas, iniciado luego de 4 semanas de hipertensión ocular.

Resultados. Se observó una disminución significativa en el número de CGR Brn3a (+) a las 15 (pero no a las 6) semanas de hipertensión ocular y una reducción en el transporte anterógrado de CTB en el colículo superior y en el núcleo geniculado lateral contralaterales a ojos inyectados con CS durante 6 y 15 semanas. En la porción proximal del NO se observó una reducción en el área positiva para pNFH, un aumento en el área Iba-1(+), ED1(+) y GFAP (+), así como signos de desmielinización a las 6 y 15 semanas de hipertensión ocular. El tratamiento con minociclina previno el incremento en las áreas Iba-1(+), ED-1(+) y GFAP(+), la reducción en el área pNFH(+) y la desmielinización, así como las alteraciones en el transporte anterógrado inducido por 6 semanas de hipertensión ocular.

Conclusión. Estos resultados sugieren que el tratamiento con minociclina podría prevenir las alteraciones axogliales tempranas en el NO glaucomatoso proximal.

Therapeutic effect of minocycline in an experimental glaucoma model

Objectives. Glaucoma, one of the main causes of blindness, involves retinal ganglion cell (RGC) death and optic nerve (ON) damage. In this paper we analyze the effect of minocycline on early axoglia changes of the ON in an experimental glaucoma model induced by weekly chondroitin sulfate (CS) injections.

Methods. Adult male Wistar rats were weekly administered either vehicle or CS injected into the anterior chamber for 6 or 15 weeks. Number of RGCs (Brn3a immunoreactivity), anterograde transport of cholera toxin subunit B (CTB) and axoglia markers in the ON (microglia: iba-1 and ED1; astrocytes: glial fibrillary acidic protein [GFAP] and axons: phosphorylated neurofilament-H [pNFH]) were analyzed by immunohistochemistry. Microglial involvement was evaluated by a daily treatment with minocycline

(30 mg/kg, i. p.) for 2 weeks, initiated after 4 weeks of ocular hypertension.

Results. There was a significant reduction in the number of Brn3a-positive RGCs after 15 (though not after 6) weeks of ocular hypertension and a decrease in CTB anterograde transport to the superior colliculus and to the lateral geniculate nucleus of eyes contralateral to those injected with CS for 6 and 15 weeks. In the proximal ON portion there was a reduction in the pNFH-positive area, and an increase in the Iba-1-positive, ED-1-positive and GFAP-positive areas, as well as demyelination signs after 6 and 15 weeks of ocular hypertension. Treatment with minocycline prevented the increase in the Iba-1-positive, ED-1-positive and GFAP-positive areas, the reduction in the pNFH-positive area and demyelination, and also any changes in anterograde transport induced by 6 weeks of ocular hypertension.

Conclusion. These results suggest that minocycline treatment might prevent early axoglia changes at the proximal glaucomatous ON.

Efeito terapêutico da monocíclica em um modelo de glaucoma experimental

Objetivos. O glaucoma, uma das principais causas de cegueira, envolve a morte das células ganglionares retiniais (CGR) e dano no nervo óptico (NO). Neste trabalho, analisamos o efeito da monocíclica sobre as alterações axogliais precoces do NO em um modelo de glaucoma experimental induzido por injeções semanais de condroitín sulfato (CS).

Métodos. Em ratos *Wistar* macho adultos se injetou semanalmente veículo ou CS em câmara anterior durante 6 ou 15 semanas. Analisou-se o número de CGR (imunorreatividade para Brn3a), o transporte anterógrado da subunidade B da toxina colérica (CTB) e marcadores axogliais no NO (micróglia: Iba-1 e ED1; astrócitos: proteína glial fibrilar ácida [GFAP] e axônios: neurofilamento fosforilado [pNFH]) por imunohistoquímica. A participação da micróglia se avaliou através de um tratamento diário com

minociclina (30 mg/kg, i. p.) durante 2 semanas, iniciado após 4 semanas de hipertensão ocular.

Resultados. Observou-se uma diminuição significativa no número de CGR Brn3a (+) às 15 (mas não às 6) semanas de hipertensão ocular e uma redução no transporte anterógrado de CTB no colículo superior e no núcleo geniculado lateral contralaterais a olhos injetados com CS durante 6 e 15 semanas. Na porção proximal do NO se observou uma redução na área positiva para pNFH, um aumento na área Iba-1(+), ED1(+) e GFAP (+), bem como sinais de desmielinização às 6 e às 15 semanas de hipertensão ocular. O tratamento com minociclina evitou o incremento nas áreas Iba-1(+), ED-1(+) e GFAP(+), a redução na área pNFH(+) e a desmielinização, assim como as alterações no transporte anterógrado induzido por 6 semanas de hipertensão ocular.

Conclusão. Estes resultados sugerem que o tratamento com minociclina poderia prevenir as alterações axogliais precoces no NO glaucomatoso proximal.

Efectos de la dexametasona sobre la supervivencia de las células del epitelio pigmentario de la retina

Marquioni-Ramella MD, Marazita M, Tate PS, Bachor T, Suro AM

Instituto de Investigación en Medicina Traslacional (IIMT), CONICET-Universidad Austral, Pilar, Buenos Aires, Argentina.
mmarquio@austral.edu.ar

Objetivos. Los glucocorticoides (GC) son de uso frecuente y de gran importancia en oftalmología para tratar diversas condiciones o enfermedades oculares. La dexametasona (DEX) se utiliza frecuentemente en el tratamiento del edema macular diabético. Por lo tanto, estudiamos la viabilidad de las células ARPE-19 (línea celular de epitelio pigmentario de la retina, EPR, humano) expuestas a diferentes concentraciones de DEX en medios con diferente contenido de glucosa y suero.

Métodos. Se emplearon medios DMEM con baja y alta glucosa (LG-DMEM, 5.6 mM y HG-DMEM, 25 mM), con 1% o 10% de suero fetal bovino (S1 y S10), con distintas concentraciones

de DEX-fosfato (0, 0.08, 0.32 o 1.28 mM). Después de 24 horas de tratamiento se evaluó la inducción de muerte celular mediante naranja de acridina/bromuro de etidio (AO/EB) y la viabilidad celular mediante 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT). Además, se evaluaron dos marcadores de diferenciación del EPR: las proteínas *retinoid isomerohydrolase* (RPE65) y *cellular retinaldehyde binding protein* (CRALBP) mediante *Western blot*.

Resultados. Los niveles más altos de DEX-fosfato (1.28 mM) resultaron tóxicos en todas las condiciones. Las concentraciones más bajas (0.08 mM) aumentaron la muerte celular en los medios con baja glucosa (17-18%), independientemente de los niveles de suero. El aumento de muerte celular en alta glucosa no fue significativo. En el ensayo de MTT, los niveles de densidad óptica (OD) fueron 27% superiores en HG-DMEM-S10 que en los restantes medios. DEX-fosfato 0.08 mM redujo la OD aproximadamente 60% en los cultivos S1 y 40% en los S10, aún en alta glucosa. La concentración de glucosa no modificó significativamente los niveles de CRALBP en los medios S10, pero aumentó los de RPE65 en HG-DMEM-S10. En presencia de 0.08 mM DEX-fosfato los niveles de CRALBP disminuyeron un 40% en LG-DMEM-S10 y solo en un 10% en HG-DMEM-S10. Los niveles de RPE65 siguieron un patrón semejante.

Conclusiones. DEX-fosfato presentó toxicidad para las células ARPE-19, que parece exacerbarse en los medios con baja glucosa.

Effects of dexamethasone on retinal pigment epithelium cell survival

Objectives. Glucocorticoids (GC) are commonly used and they are very important in ophthalmic practice for the treatment of many ocular conditions or diseases. Dexamethasone (DEX) is usually used in the treatment of diabetic macular edema. Therefore, we have studied the viability of ARPE-19 cells (a human retinal pigment epithelial cell line, [RPE]) exposed to different DEX

concentrations in media of different glucose and serum content.

Methods. Low- and high-glucose DMEM media (LG-DMEM, 5.6 mM and HG-DMEM, 25 mM), with 1% or 10% bovine fetal serum (S1 and S10), at different concentrations of DEX-phosphate (0, 0.08, 0.32 or 1.28 mM) were used. After 24 hours of treatment, cell death was evaluated using acridine orange/ethidium bromide (AO/EB), and cell viability, by means of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. In addition, two RPE differentiation markers, retinoid isomerohydrolase (RPE65) and cellular retinaldehyde binding proteins (CRALBP) were assessed by Western blotting.

Results. The highest DEX-phosphate levels (1.28 mM) turned out to be toxic in all conditions. The lowest concentrations (0.08 mM) increased cell death in all low-glucose media (17-18%), regardless of the serum levels used. Cell death increase when using high glucose failed to be significant. According to the results of the MTT assays, optical density (OD) levels were 27% higher in HG-DMEM-S10 than in the other media. 0.08 mM DEX-phosphate reduced OD by approximately 60% in S1 cultures, and 40% in S10, even with high glucose. Glucose concentration did not significantly change CRALBP levels in S10 media, but it did increase RPE65 in HG-DMEM-S10. However, CRALBP levels decrease by 40% in the presence of 0.08 mM DEX-phosphate in LG-DMEM-S10 and only by 10% in HG-DMEM-S10. RPE65 levels followed a similar pattern.

Conclusions. DEX-phosphate evidenced toxicity for ARPE-19 cells, and this seems to exacerbate in low-glucose media.

Efeitos da dexametasona sobre a sobrevivência das células do epitélio pigmentar da retina

Objetivos. Os glicocorticóides (GC) são de uso frequente e de grande importância em oftalmologia para tratar diversas condições

ou doenças oculares. A dexametasona (DEX) se utiliza frequentemente no tratamento do edema macular diabético. Por isso, estudamos a viabilidade das células ARPE-19 (linha celular de epitélio pigmentar da retina, EPR, humano) expostas a diferentes concentrações de DEX em meios com diferente conteúdo de glicose e soro.

Métodos. Empregaram-se meios DMEM com baixa e alta glicose (LG-DMEM, 5.6 mM e HG-DMEM, 25 mM), com 1% ou 10% de soro fetal bovino (S1 e S10), com distintas concentrações de DEX-fosfato (0, 0.08, 0.32 o 1.28 mM). Depois de 24 horas de tratamento foi avaliada a indução de morte celular mediante laranja de acridina/bromuro de etídio (AO/EB) e a viabilidade celular mediante 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT). Além disso, avaliaram-se dois marcadores de diferenciação do EPR: as proteínas *retinoid isomerohydrolase* (RPE65) e *cellular retinaldehyde binding protein* (CRALBP) mediante *Western blot*.

Resultados. Os níveis mais altos de DEX-fosfato (1.28 mM) resultaram tóxicos em todas as condições. As concentrações menores (0.08 mM) aumentaram a morte celular nos meios com baixa glicose (17-18%), independentemente dos níveis de soro. O aumento de morte celular em alta glicose não foi significativo. No ensaio de MTT, os níveis de densidade óptica (OD) foram 27% superiores em HG-DMEM-S10 que nos outros meios. DEX-fosfato 0.08 mM reduziu a OD aproximadamente 60% nas culturas S1 e 40% nas S10, ainda em alta glicose. A concentração de glicose não modificou significativamente os níveis de CRALBP nos meios S10, mas aumentou os de RPE65 em HG-DMEM-S10. Em presença de 0.08 mM DEX-fosfato os níveis de CRALBP diminuíram 40% no LG-DMEM-S10 e apenas 10% em HG-DMEM-S10. Os níveis de RPE65 seguiram um padrão semelhante.

Conclusões. DEX-fosfato apresentou toxicidade para as células ARPE-19, que parece exacerbar-se nos meios com baixa glicose.

Efectos del hipertiroidismo sobre la diferenciación neuro-glio-vascular durante la regeneración retiniana de zebrafish adulto

Bejarano CA, Faillace MP

Instituto de Fisiología y Biofísica Bernardo Houssay, UBA-CONICET
cbejarano@fmed.uba.ar

Introducción. Se ha descripto que alteraciones de la interacción funcional entre neuronas, células de la glía y vasos sanguíneos subyace a diferentes patologías del SNC, incluyendo patologías retinales. El zebrafish adulto (ZF) es capaz de regenerar varios tejidos y órganos, siendo un modelo adecuado para estudiar la regulación de la génesis y diferenciación celular.

Objetivos. Examinar el efecto de desequilibrios en la señalización tiroidea sobre la reparación del circuito neuro-glio-vascular durante la regeneración de la retina en el ZF.

Materiales y métodos. Se lesionaron las retinas de un grupo de ZF con una inyección intravítrea de ouabaina y el grupo control con solución salina. A su vez, se separaron los animales en cuatro grupos; se trataron con TH (300 µg/L) o con vehículo (NaOH 0.1 M) en el agua de la pecera hasta los 25 días postinjuría (dpi) cuando se realizó la eutanasia. Se realizó inmunofluorescencia simple y doble para detectar diferentes poblaciones celulares y vascularización sobre el tejido retinal. Se detectaron los niveles de ARNm de los TRs, receptores para VEGF (VEGFRs) y marcadores de tipos celulares en la retina, mediante la técnica de RT-PCR estándar y cuantitativa.

Los datos fueron analizados con ANOVA & Bonferroni-Test, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $P < 0,001$.

Resultados. En el tratamiento a largo plazo con una elevada concentración de TH (25 dpi) se observó neovascularización retinal. El análisis histológico y la inmunomarcación de poblaciones y capas celulares demostró cambios significativos en el número de células, así como en las dimensiones de las capas y conexiones sinápticas. Se describieron variaciones significativas en la expresión del ARNm de TRs, VEGFRs y marcadores celulares retinales que correlacionan con los cambios morfológicos observados con los distintos tratamientos.

Conclusiones. El sistema de señalización de TH regula los procesos de diferenciación celular y angiogénesis durante la regeneración retinal. Proponemos que los cambios observados en las retinas lesionadas y tratadas con un exceso de TH a largo plazo son compatibles con los procesos descriptos en retinopatías neurodegenerativas, con elevada gliosis y neovascularización.

Effects of hyperthyroidism on neuro-glio-vascular differentiation during adult zebrafish retinal regeneration

Introduction. The presence of underlying alterations in the functional interaction between neurons, glial cells and blood vessels has been described with different CNS disorders, including retinal conditions. The adult zebrafish (ZF) is able to regenerate several tissues and organs, therefore it is an adequate model to study the regulation of cell genesis and differentiation.

Objectives. To examine the effect of thyroid signaling imbalances on repair of the neuro-glio-vascular circuit during retinal regeneration in the ZF.

Materials and methods. Injuries were inflicted on the retinas of a ZF group by means of an ouabain intravitreal injection, while the control group received a saline solution injection. At the same time, animals were divided into four groups and they were administered TH (300 µg/L) or vehicle (NaOH 0.1 M) into the fishbowl water up to 25 days post-injury (dpi), when they were euthanized. Single and double immunofluorescence assays were used to detect different cell populations and vascularization on the retinal tissue. Levels of TR mRNA, VEGF receptors (VEGFRs) and retinal cell type markers were detected by using standard and quantitative RT-PCR techniques.

Data were analyzed with ANOVA and Bonferroni Test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $P < 0.001$.

Results. Retinal neovascularization was observed with long-term treatment with an elevated TH concentration (25 dpi). Histologic analysis and immunomarking of cell popula-

tions and layers evidenced significant changes in the number of cells, as well as in the dimensions of synaptic layers and connections. Significant variations in TR mRNA, VEGFR and retinal cell marker expression correlating with morphologic changes observed with the different therapies have been described. *Conclusions.* The TH signaling system regulates cell differentiation and angiogenesis processes during retinal regeneration. We here propose that changes observed in the retinas injured and treated with an excess of TH for a long period are compatible with the processes described in neurodegenerative retinopathies, with elevated gliosis and neovascularization.

Efeitos do hipertiroidismo sobre a diferenciação neuro-glio-vascular durante a regeneração retinal de zebrafish adulto

Introdução. Têm sido descritas quais as alterações da interação funcional entre neurônios, células da glia e vasos sanguíneos, subjazem a diferentes patologias do SNC, incluindo patologias retiniais. O zebrafish adulto (ZF) é capaz de regenerar vários tecidos e órgãos, sendo um modelo adequado para estudar a regulação da gênese e diferenciação celular.

Objetivos. Examinar o efeito de desequilíbrios na sinalização tireoide sobre a reparação do circuito neuro-glio-vascular durante a regeneração da retina no ZF.

Materiais e métodos. Lesionaram-se as retinas de um grupo de ZF com uma injeção intravítrea de ouabaína e o grupo controle com solução salina. Paralelamente, separaram-se os animais em quatro grupos; foram tratados com TH (300 µg/L) ou com veículo (NaOH 0.1 M) na água do aquário até os 25 dias pós-injúria (dpi) quando foi realizada eutanásia. Realizou-se imunofluorescência simples e dupla para detectar diferentes populações celulares e vascularização sobre o tecido retinal. Detectaram-se os níveis de ARNm dos TRs, receptores para VEGF (VEGFRs) e marcadores de tipos celulares na retina, mediante a técnica de RT-PCR padrão e quantitativa.

Os dados foram analisados com ANOVA & Bonferroni-Test, *p<0,05, **p<0,01 y ***P<0,001.

Resultados. No tratamento em longo prazo com uma elevada concentração de TH (25 dpi) se observou neovascularização retiniana. A análise histológica e a imunomarcagem de populações e camadas celulares demonstrou alterações significativas no número de células, assim como nas dimensões das camadas e conexões sinápticas. Descreveram-se variações significativas na expressão do ARNm de TRs, VEGFRs e marcadores celulares retiniais que correlacionam com as alterações morfológicas observadas nos distintos tratamentos.

Conclusões. O sistema de sinalização de TH regula os processos de diferenciação celular e angiogênese durante a regeneração retiniana. Propomos que as alterações observadas nas retinas lesionadas e tratadas com excesso de TH no longo prazo são compatíveis com os processos descritos em retinopatias neurodegenerativas, com elevada gliose e neovascularização.

Efecto de compuestos polifenólicos en la respuesta senescente en células del epitelio pigmentario de la retina

Tate PS, Marazita MC, Marquioni-Ramella MD, Bachor TP, Suburo AM

Instituto de Investigaciones en Medicina Traslacional (IIMT), Universidad Austral-CONICET.

pablotate2@gmail.com

Introducción. La degeneración macular asociada con la edad (DMAE) es una enfermedad crónica progresiva de la retina que lleva a la pérdida irreversible de la visión. Se postula que la senescencia celular prematura del EPR podría jugar un papel principal en su etiopatogénesis. El estrés oxidativo es un inductor conocido de senescencia celular y tienen un papel principal en la progresión de la AMD. Los polifenoles, micronutrientes presentes en la dieta son capaces de dar protección frente a enfermedades degenerativas. Los ácidos cafeico y clorogénico, polifenoles presentes en altas concentraciones en la yerba mate, podrían ofrecer protección frente al estrés oxidativo.

Objetivos. Estudiar el efecto de los ácidos cafeico y clorogénico en la inducción de senescencia promovida por daño oxidativo en células del EPR y determinar las vías de acción involucradas. **Hipótesis.** Los polifenoles disminuyen los efectos del daño oxidativo inducido por H₂O₂ y evitan el desarrollo del fenotipo senescente modulando la expresión de sirtuinas y de antioxidantes como la superóxido dismutasa 2 (SOD2).

Metodología. Se trataron células ARPE-19 con ácido cafeico (12,5 µg/ml) o ácido clorogénico (100 µM) durante 2 horas y luego se expusieron a H₂O₂ (150 µM) por 90 minutos. Los niveles de ROS fueron medidos utilizando la sonda fluorescente DCFH-DA y citometría de flujo. Se cuantificaron los focos de γH2AX por inmunofluorescencia para evaluar el daño del ADN. Para valorar la inducción de senescencia se analizó la actividad de β-galactosidasa por inmunohistoquímica y la expresión de otros dos marcadores característicos de senescencia, p21 y p16, por *Western blot*. Los niveles de mRNA para (sirtuina 3) SIRT3 y SOD2 se evaluaron por qPCR.

Resultados. Ambos tratamientos redujeron significativamente los niveles de ROS y el número de focos de γH2AX. Además, disminuyó significativamente el número de células β-gal+ en respuesta al daño por H₂O₂. Resultados similares se observaron en la expresión de p21 y p16. Ambos compuestos aumentaron la expresión de SIRT3 y SOD2.

Conclusiones. Tanto el ácido cafeico como el ácido clorogénico protegen contra el daño oxidativo en células ARPE-19, modulando la expresión de genes que mejoran la capacidad antioxidante y disminuyendo la activación del mecanismo de senescencia celular. Estos tratamientos podrían tener implicancias en el control de la degeneración del EPR característica de la DMAE.

Effect of polyphenolic compounds on the senescent response in retinal pigment epithelium cells

Introduction. Age-related macular degeneration (ARMD) is a progressive chronic retinal

disease leading to irreversible visual loss. It has been postulated that early cell senescence of the RPE might play a major role in its etiopathogenesis. Oxidative stress is a known cell senescence inducer and it has a major role in ARMD. Polyphenols, micronutrients present in the diet, are able to protect against degenerative diseases. Caffeic and chlorogenic acids, polyphenols that can be found at high concentrations in yerba mate (*Ilex paraguariensis*), might offer protection against oxidative stress.

Objectives. To study the effect of caffeic and chlorogenic acids on the induction of senescence promoted by oxidative stress in RPE cells and to determine the action pathways involved.

Hypothesis. Polyphenols reduce H₂O₂-induced oxidative damage effects and prevent the development of senescent phenotypes by modulating the expression of sirtuins and antioxidants such as superoxide dismutase 2 (SOD2).

Methodology. ARPE-19 cells were treated with caffeic acid (12.5 µg/ml) or chlorogenic acid (100 µM) for 2 hours and then exposed to H₂O₂ (150 µM) for 90 minutes. ROS levels were measured using a DCFH-DA fluorescent probe and flow cytometry. Gamma-H2AX foci were quantitated by immunofluorescence to evaluate DNA damage. In order to assess senescence induction, beta-galactosidase activity was analyzed by immunohistochemistry, and the expression of other typical markers of senescence, p21 and p16, was measured by Western blotting. mRNA levels for sirtuin 3 (SIRT3) and SOD2 were evaluated by qPCR.

Results. Both treatments significantly reduced ROS levels and the number of gamma-H2AX foci. In addition, the number of beta-gal-positive cells decreased significantly in response to H₂O₂-induced damage. Similar results were observed in p21 and p16 expression. Both compounds increased SIRT3 and SOD2 expression.

Conclusions. Both caffeic and chlorogenic acid exert a protective effect against oxidative stress in ARPE-19 cells, by modulating the expression of genes that improve the antioxidant ability and reducing activation of the cell senescence mechanism. These therapies might have implications

in the control of RPE degeneration that characterizes ARMD.

Efeito de compostos polifenólicos na resposta senescente em células do epitélio pigmentar da retina

Introdução. A degeneração macular associada com a idade (DMAE) é uma doença crônica progressiva da retina que leva a perda irreversível da visão. Postula-se que a senescência celular precoce do EPR poderia jogar um papel principal em sua etiopatogênese. O estresse oxidativo é um indutor conhecido de senescência celular e tem um papel principal na progressão da AMD. Os polifenóis, micronutrientes presentes na dieta são capazes de dar proteção ante doenças degenerativas. Os ácidos caféico e clorogênico, polifenóis presentes em altas concentrações na erva mate, poderiam oferecer proteção ante o estresse oxidativo.

Objetivos. Estudar o efeito dos ácidos caféico e clorogênico na indução de senescência promovida pelo dano oxidativo em células do EPR e determinar as vias de ação envolvidas.

Hipótese. Os polifenóis diminuem os efeitos do dano oxidativo induzido por H₂O₂ e evitam o desenvolvimento do fenotipo senescente modulando a expressão de sirtuínas e de antioxidantes como a superóxido dismutase 2 (SOD2).

Metodologia. Trataram-se células ARPE-19 com ácido caféico (12,5 µg/ml) ou ácido clorogênico (100 µM) durante 2 horas e depois foram expostas a H₂O₂ (150 µM) por 90 minutos. Os níveis de ROS foram medidos utilizando a sonda fluorescente DCFH-DA e citometria de fluxo. Quantificaram-se os focos de γH2AX por *imunofluorescência* para avaliar o dano do ADN. Para valorar a indução de senescência se analisou a atividade de β-galactosidase por *imuno-histoquímica* e a expressão de outros dois marcadores característicos de senescência, p21 e p16, por *Western blot*. Os níveis de mRNA para (sirtuína 3) SIRT3 e SOD2 foram avaliados por qPCR.

Resultados. Ambos os tratamentos reduziram significativamente os níveis de ROS e o número de focos de γH2AX. Além disso, diminuiu sig-

nificativamente o número de células β-gal+ em resposta ao dano por H₂O₂. Resultados semelhantes observaram-se na expressão de p21 e p16. Ambos os compostos aumentaram a expressão de SIRT3 e SOD2.

Conclusões. Tanto o ácido caféico como o ácido clorogênico protegem contra o dano oxidativo em células ARPE-19, modulando a expressão de genes que melhoram a capacidade antioxidante e diminuindo a ativação do mecanismo de senescência celular. Estes tratamentos poderiam ter implicações no controle da degeneração do EPR característica da DMAE.

Potencialidad del sistema FVC100 de sensibilidad al contraste en ambliopía

Alcalde NG, Colombo EM

Departamento de Luminotecnia, Luz y Visión (DLLyV), Facultad de Ciencias Exactas y Tecnología (FACET), Universidad Nacional de Tucumán (UNT), San Miguel de Tucumán, Argentina.

Instituto de Investigación en Luz, Ambiente y Visión (ILAV), UTN-CO-NICET

noeg.alcalde69@gmail.com

Objetivo. Evaluar la potencialidad del sistema FVC100 para determinar la función de sensibilidad al contraste (FSC) como descriptor de la visión funcional en ambliopes, contrastándolo con el CSV1000E, un sistema comercial.

Métodos. Oftalmólogos de la UNT seleccionaron pacientes mediante evaluación de historias clínicas y según el siguiente criterio: sujetos de 10 años de edad o más con ambliopías refractivas, por estrabismo o privación, que pasaron las pruebas oftalmológicas básicas (fondo de ojo, tonometría, etc.). Mediciones psicofísicas: 1) AV monoculares, 2) sensibilidad al contraste (SC) monoculares: a) con el sistema CSV-1000E (test comercial de láminas impresas), b) con el FVC100 (sistema informatizado) realizando tres repeticiones de cada condición experimental.

Resultados. Los análisis descriptivos y estadísticos muestran que las repeticiones de las mediciones con el FVC100 son innecesarias en una evaluación clínica. Además, se observó que en general el mejor ojo del sujeto ambliope podría considerarse como el ojo de una persona normal y tomarlo como control. Al comparar ambos sistemas, los valores de SC obtenidos con el CSV1000E

son en general menores a los del FVC100, posiblemente porque el primero presenta una cantidad fija de estímulos y contrastes, mientras que el segundo provee más estímulos de diferentes contrastes, lo que lo hace más sensible. A su vez, se observan casos en que el CSV1000E estaría sobrestimando los valores de SC. Para finalizar, se destaca que las curvas en general presentan las formas descritas en la bibliografía.

Conclusiones. Se concluye que el FVC100 tiene potencialidad para evaluar diferencias muchas veces poco perceptibles con otros sistemas de medida y también para distinguir los diferentes tipos de ambliopías según la forma de la FSC obtenida. Los resultados evidencian la robustez de la medición de SC con el sistema FVC100, el cual puede ser transferido exitosamente a la clínica oftalmológica.

Potentiality of the FVC100 system for contrast sensitivity measurement in amblyopia

Objective. To evaluate the potentiality of the FVC100 system for determination of contrast sensitivity (CS) function as a descriptor of functional vision in amblyopic eyes, and to compare it with the CSV100E, a commercial system.

Methods. Ophthalmologists from the UNT selected patients by reviewing clinical records and according to the following criterion: 10-year-old or older individuals with refractive amblyopia, due to strabismus or deprivation, who had undergone the basic ophthalmologic tests (funduscopy, tonometry, etc.). Psychophysical measurements: 1) monocular VA, 2) monocular contrast sensitivity (CS): a) with the CSV1000E system (commercial test of printed cardboards), b) with the FVC100 (computerized system), with three repetitions of each experimental condition.

Results. Descriptive and statistical analyses evidence that FVC100 repeated measurements are unnecessary in clinical evaluation. In addition, in most cases, it has been observed that the amblyopic individual's best eye may be considered as the eye of a normal person and be used as a control. When comparing both systems, CS values obtained with the CSV1000E are, in general, lower

than those obtained with the FVC100, maybe because the former has a fixed number of stimuli and contrasts, while the latter provides more stimuli of different contrasts, thereby rendering it more sensitive. In turn, there are some cases in which the CSV1000E is likely to overestimate CS values. Of note, it is stressed that curves generally present the forms described in the literature.

Conclusions. It is concluded that the FVC100 device has the potentiality to evaluate differences that are usually poorly perceived by other measurement systems as well as to distinguish the different types of amblyopias according to the CSF form obtained. Results evidence the robustness of CS measurements performed with the FVC100 system, which can be successfully transferred to the ophthalmologic clinic.

Potencialidade do sistema FVC100 de sensibilidade ao contraste em ambliopia

Objetivo. Avaliar a potencialidade do sistema FVC100 para determinar a função de sensibilidade ao contraste (FSC) como descritor da visão funcional em ambliopes, contrastando com o CSV1000E, um sistema comercial.

Métodos. Oftalmologistas da UNT selecionaram pacientes mediante avaliação de históricos clínicos e segundo o seguinte critério: sujeitos de 10 anos de idade ou mais com ambliopias refrativas, por estrabismo ou derivação, que passaram as provas oftalmológicas básicas (fundo de olho, tonometria, etc.). Medições psicofísicas: 1) AV monoculares, 2) sensibilidade ao contraste (SC) monoculares: a) com o sistema CSV-1000E (teste comercial de lâminas impressas), b) com o FVC100 (sistema informatizado) realizando três repetições de cada condição experimental.

Resultados. As análises descritivas e estatísticas mostram que as repetições das medições com o FVC100 são desnecessárias em uma avaliação clínica. Além disso, observou-se que em geral o melhor olho do sujeito ambliope poderia ser considerado como o olho de uma pessoa normal e tê-lo como controle. Ao comparar ambos os sistemas, os valores de SC obtidos com o CSV1000E são em geral menores aos do

FVC100, possivelmente porque o primeiro apresenta uma quantidade fixa de estímulos e contrastes, enquanto o segundo fornece mais estímulos de diferentes contrastes, o que faz com que seja mais sensível. Por sua vez, observam-se casos nos que CSV1000E estaria sobrestimando os valores de SC. Para finalizar, destaca-se que as curvas em geral apresentam as formas descritas na bibliografia.

Conclusões. Pode-se concluir que o FVC100 tem potencialidade para avaliar diferenças muitas vezes pouco perceptíveis com outros sistemas de medida e também para distinguir os diferentes tipos de ambliopias segundo a forma da FSC obtida. Os resultados evidenciam a robustez da medição de SC com o sistema FVC100, o qual pode ser transferido com sucesso à clínica oftalmológica.

Mecanismos cromáticos y acromáticos de potenciales evocados visuales multifocales (mfVEP)

Araújo CS^a, Souza GS^{ab}, Kilemi CG^c, Smyth MA^d, Johnson SL^e, Jacob MM^a, Lacerda EMC^b, Fitzgerald MEC^c, Silveira LCL^{abf}, Gomes BD^a, Souza GS^{ab}

^a Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, Brasil.

^b Núcleo de Medicina Tropical, Universidade Federal do Pará, Belém, Brasil.

^c Coppin State University, Baltimore, Maryland, Estados Unidos.

^d Rhodes College, Memphis, Tennessee, Estados Unidos.

^e Christian Brothers University, Memphis, Tennessee, Estados Unidos.

^f Universidade Ceuma, São Luís, Maranhão, Brasil.

carolinacsa@gmail.com

Objetivo. Investigar la contribución de mecanismos cromáticos y acromáticos en potenciales evocados visuales multifocales (mfVEPs).

Métodos. Se presentaron estímulos de tableros de dardos con 60 sectores, que abarcaban 40° de ángulo visual, a 14 sujetos (12 tricromatas normales, 1 protan y 1 deutan), en presentación reversa controlada temporalmente por secuencias-m en 7 diferentes proporciones de luminancia rojo-verde (R/R + G) y en una condición acromática (100% contraste Michelson). Una correlación cruzada entre el estímulo y el registro permitió extraer el kernels. Se extrajeron el primer *slice* (K2.1) y el segundo *slice* (K2.2) del *kernel* de segundo

orden. Se analizó la relación señal-ruido (SNR) de las formas de onda para clasificarlos como fiable (SNR > 1,35) o no fiable (SNR < 1,35). Se cuantificó el número de formas de onda fiables en 6 diferentes anillos de la misma excentricidad visual (R1 fue el anillo central y R6 fue el más periférico).

Resultados. Los resultados fueron similares para K2.1 y K2.2. Para los tricromatas normales, en los anillos de R1-R4, todas las relaciones de luminancia rojo-verde tenían proporción similar de formas de onda fiables. En los anillos R5-R6 había formas de onda más fiables en las relaciones de luminancia rojo-verde con un alto contraste de luminancia, mientras que la condición equi-luminante tuvo el menor número de respuestas fiables. Los sujetos protan y deutan mostraron resultados invertidos y las funciones con el mínimo de desplazamiento de la razón de luminancia fue de 0,6 (protan) y de 0,4 (deutan).

Conclusión: Los *slices* del *kernels* de segundo orden fueron útiles para estudiar los mecanismos cromáticos y acromáticos del mfVEP. Los resultados R1-R4 indican una contribución similar de mecanismos acromáticos y cromáticos al mfVEP, mientras que R5-R6 mostró una contribución más pronunciada del mecanismo acromático al mfVEP. El método utilizado en el presente estudio nos permitió separar los datos protan y deutan.

Chromatic and achromatic mechanisms in multifocal visual evoked potentials (mfVEP)

Objective. To investigate the contribution of chromatic and achromatic mechanisms to multifocal visual evoked potentials (mfVEPs).

Methods. Fourteen (12 normal trichromatic, 1 protan and 1 deutan) individuals were evaluated by visual stimulation using a 60-sector dartboard display covering a visual angle of 40° in reversal mode temporarily controlled by m-sequences using 7 different red-green luminance ratios (R/R + G), and also at achromatic condition (100% Michelson contrast). Kernels were obtained by a cross-correlation between the stimulus and the response. The first (K2.1) and second (K2.1) slices of the second-order kernel were obtained. Signal-

noise ratios (SNR) of waveforms were analyzed to classify them into reliable (SNR > 1.35) or unreliable (SNR < 1.35). The number of reliable waveforms at different rings of the same visual eccentricity (R1 was the central ring and R6, the outermost one) was determined.

Results. Results were similar for K2.1 and K2.2. For normal trichromatic subjects, at R1-R4, all red-green luminance ratios had similar reliable waveform proportions. For R5-R6 there were more reliable waveforms in red-green luminance ratios, with a high luminance contrast, while equiluminant conditions had a lower number of reliable responses. Protan and deutan individuals evidenced inverse results, and functions with the minimal shift in luminance ratio showed values of 0.6 (protan) and 0.4 (deutan).

Conclusion: Slices of second-order kernels were useful to study the chromatic and achromatic mechanisms of mfVEP. R1-R4 results indicate a similar contribution of achromatic and chromatic mechanisms to mfVEP, while R5-R6 evidence a greater contribution of the achromatic mechanism to mfVEP. The method used in this study allowed us to separate data between those for protan and those from deutan individuals.

Mecanismos cromáticos e acromáticos de potenciais evocados visuais multifocais (mfVEP)

Objetivo. Pesquisar a contribuição de mecanismos cromáticos e acromáticos em potenciais evocados visuais multifocais (mfVEPs).

Métodos. Apresentaram-se estímulos de tabuleiros de dardos com 60 setores, que abarcavam 40° de ângulo visual, a 14 sujeitos (12 tricromatas normais, 1 protan e 1 deutan), em apresentação reversa controlada temporalmente por sequências-m em 7 diferentes proporções de luminância vermelho-verde (R/R + G) e em uma condição acromática (100% contraste Michelson). Uma correlação cruzada entre o estímulo e o registro permitiu extrair o kernels. Extraíram-se o primeiro *slice* (K2.1) e o segundo *slice* (K2.2) do *kernel* de segunda ordem. Analisou-se a relação sinal-ruído (SNR) das formas de onda para classificar como fiável (SNR > 1,35) ou não fiável

(SNR < 1,35). Quantificou-se o número de formas de onda fiáveis em 6 diferentes anéis da mesma excentricidade visual (R1 foi o anel central e R6 foi o mais periférico).

Resultados. Os resultados foram semelhantes para K2.1 e K2.2. Para os tricromatas normais, nos anéis de R1-R4, todas as relações de luminância vermelho-verde tinham proporção semelhante de formas de onda fiáveis. Nos anéis R5-R6 havia formas de onda mais fiáveis nas relações de luminância vermelho-verde com um alto contraste de luminância, enquanto a condição equi-iluminante teve o menor número de respostas fiáveis. Os sujeitos protan e deutan mostraram resultados invertidos e as funções com o mínimo de deslocamento da razão de luminância foi de 0,6 (protan) e de 0,4 (deutan).

Conclusão. Os *slices* do *kernels* de segunda ordem foram úteis para estudar os mecanismos cromáticos e acromáticos do mfVEP. Os resultados R1-R4 indicam uma contribuição semelhante de mecanismos acromáticos e cromáticos ao mfVEP, enquanto R5-R6 mostrou uma contribuição mais pronunciada do mecanismo acromático ao mfVEP. O método utilizado no presente estudo permitiu separar os dados protan e deutan.

Hialocitos de ratones: aislamiento y caracterización

Costa GJL, Akamine PS, Hamassaki DE

Departamento de Biología Celular e do Desenvolvimento, Instituto de Ciências Biomédicas (ICB), Universidade de São Paulo (USP), Brasil. gabrielalustoza@usp.br

Objetivos. Los hialocitos, escasas células del vítreo, están involucrados en distintos procesos fisiológicos y patológicos oculares que ocurren, por ejemplo, en las modificaciones del vítreo durante el envejecimiento y en patologías vitreoretiniales. La mayor parte del vítreo se produce durante el desarrollo que parte de células gliales de Müller, del epitelio ciliar y del sistema vascular hialoideo. Nuestro objetivo fue identificar y caracterizar los hialocitos de ratas recién nacidas y adultas con inmunofluorescencia utilizando marcadores celulares distintos y establecer un cultivo de esas células a partir del vítreo adulto.

Métodos. Aprobado por el Comité Ético de Experimentación Animal (ICB/USP # 75-2015). Se sacrificaron ratas Wistar recién nacidas (n=5 animales) y adultas (n=15) con CO₂ y se realizó la enucleación, la disección y la fijación de sus ojos para obtenerse el sistema vascular hialoide y secciones transversales de retina y retinas a plano, conservando el vítreo cortical. También se utilizaron los vítreos de ratas adultas para obtener un cultivo de hialocitos. Los anticuerpos para la detección de hialocitos: anti-ED2, anti-CD169, y células gliales: anti-vimentina, anti-GFAP y anti-glutamina sintetase se visualizaron mediante anticuerpos secundarios fluorescentes Alexa Fluor 488 en un microscopio Leitz.

Resultados. Se observaron células pequeñas, redondeadas y dispersas, posiblemente hialocitos, marcadas con anti-ED2, pero no con otros anticuerpos, en la periferia de los vasos del sistema hialoide y en la interfaz vitreoretinal. Se presentó inmunoreactividad para anti-GFAP y con menor intensidad para anti-vimentina y anti-glutamina sintetase en los procesos de astrocitos y de células de Müller en la parte más interna de la retina. Después de 30 días de cultivo del vítreo, las células obtenidas no expresaron ED-2, y sí α -SMA.

Conclusiones. El anticuerpo contra ED2 hizo la marcación *in vivo* de una población de células similares a hialocitos descritos en la literatura, tanto con recién nacidos como con adultos. Una posibilidad es que *in vitro* esos probables hialocitos ya estén en proceso de transdiferenciación con adquisición de características de miofibroblastos.

Hyalocytes in mice: isolation and characterization

Objectives. Hyalocytes, cells found scarcely in the vitreous, are involved in different ocular physiologic and pathologic processes occurring, for instance, in vitreous changes during ageing and in vitreoretinal disorders. Most of the vitreous is generated during development from Müller glial cells, and from ciliary epithelial and hyaloid vascular system cells. Our goal was to identify and characterize hyalocytes of newborn

and adult rats using immunofluorescence and different cell markers, and to culture these cells from adult vitreous.

Methods. With the approval of the Animal Experimentation Ethics Committee (ICB/USP # 75-2015), enucleation, dissection and fixation of eyes from newborn (n= 5) and adult (n= 15) Wistar rats, later sacrificed with CO₂, were performed to obtain the hyaloid vascular system and cross sections of the retina as well as flat-mounts of it, with preservation of the cortical vitreous. Vitreouses of adult rats were also used to obtain a hyalocyte culture. Antibodies for detection of hyalocytes: anti-ED1, anti-CD169, and of glial cells: anti-vimentin, anti-GFAP and anti-glutamine synthetase, were visualized by means of Alexa Fluor 488 fluorescent secondary antibodies in a Leitz microscope.

Results. Small, rounded and scattered cells, probably hyalocytes, labeled with anti-ED2, but not with other antibodies, were observed at the periphery of hyaloid system vessels and at the vitreoretinal interface. There was immunoreactivity for anti-GFAP and lower for anti-vimentin and anti-glutamine synthetase in the astrocyte and Müller cell processes at the innermost part of the retina. After 30 days of vitreous culture, cells obtained failed to express ED-2 but they did express alpha-SMA.

Conclusions. There was *in vivo* anti-ED2 antibody labeling in a population of cells similar to hyalocytes described in the literature, both in newborns and in adults. A possible explanation is that these cells likely to be hyalocytes may already be undergoing a transdifferentiation process with acquisition of myofibroblast characteristics *in vitro*.

Hialocitos de ratos: isolamento e caracterização

Objetivos. Os hialocitos, escasas células do vítreo, estão envolvidos em diferentes processos fisiológicos e patológicos oculares que ocorrem, por exemplo, nas modificações do vítreo durante o envelhecimento e em patologias vitreoretinais. A maior parte do vítreo se produz durante o desenvolvimento que parte de células gliais de Müller, do epitélio ciliar e do sistema vascular hialoide. Nosso

objetivo foi identificar e caracterizar os hialocitos de ratos recém-nascidos e adultos com imunofluorescência utilizando marcadores celulares distintos e estabelecer uma cultura dessas células a partir do vítreo adulto.

Métodos. Aprovado pelo Comitê Ético de Experimentação Animal (ICB/USP # 75-2015). Sacrificaram-se ratos Wistar recém-nascidos (n=5 animais) e adultos (n=15) com CO₂ e se realizou a enucleação, a dissecação e a fixação de seus olhos para obter o sistema vascular hialoide e seções transversais de retina e retinas a plano, conservando o vítreo cortical. Também foram utilizados os vítreos de ratos adultos para obter uma cultura de hialocitos. Os anticorpos para a detecção de hialocitos: anti-ED2, anti-CD169, e células gliais: anti-vimentina, anti-GFAP e anti-glutamina sintetase se visualizaram mediante anticorpos secundários fluorescentes Alexa Fluor 488 em um microscópio Leitz.

Resultados. Observaram-se células pequenas, arredondadas e dispersas, possivelmente hialocitos, marcadas com anti-ED2, mas não com outros anticorpos, na periferia dos vasos do sistema hialoide e na interface vitreoretinal. Apresentou-se imunoreactividade para anti-GFAP e com menor intensidade para anti-vimentina e anti-glutamina sintetase nos processos de astrocitos e de células de Müller na parte mais interna da retina. Depois de 30 dias de cultura do vítreo, as células obtidas não expressaram ED-2, e sim α -SMA.

Conclusões. O anticorpo contra ED2 fez com que a marcação *in vivo* de uma população de células semelhantes a hialocitos descritos na literatura, tanto com recém-nascidos quanto com adultos. Uma possibilidade é que *in vitro* esses prováveis hialocitos já estejam em processo de transdiferenciação com aquisição de características de miofibroblastos.

Causas y características epidemiológicas de las uveítis en un hospital público de Buenos Aires

Cesari J, Senlle E, Plano L, Inga E, Franco P.
Hospital Oftalmológico Santa Lucía, Buenos Aires, Argentina.

Objetivo. Las uveítis son un grupo de enfermedades que difieren según la región geográfica que

se analice, por eso es de suma importancia conocer las etiologías que predominan en el medio. El objetivo de este trabajo es analizar las causas más frecuentes y características epidemiológicas de las uveítis que consultan el Servicio de uveítis del Hospital Oftalmológico Santa Lucía de Buenos Aires, Argentina.

Métodos. Se analizó la base de datos de pacientes que consultaron por primera vez al servicio de uveítis en el período comprendido entre el 14 de abril y el 6 de octubre del 2016. Para su clasificación se utilizaron los criterios del SUN (*standardization uveitis nomenclature*).

Resultados. Consultaron un total de 98 pacientes, se excluyeron del análisis 12 pacientes por falta de datos y 5 pacientes que tenían diagnóstico de escleritis. De los 81 pacientes analizados, 41 (50.6%) eran mujeres, el promedio de edad fue de 38 años (16-72). Según la clasificación anatómica el 36% correspondieron a uveítis anteriores, el 4% a intermedias, el 50% posteriores y el 10% panuveítis. Las uveítis infecciosas fueron las más frecuentes con el 51.8% y la causa más prevalente fue la toxoplasmosis con el 88% de los casos. Dentro de las uveítis no infecciosas la uveítis anterior idiopática fue la más frecuente con el 64% seguida por Vogt Koyanagi Harada con el 13%.

Conclusión. La toxoplasmosis fue la causa más frecuente reportada como sugieren otros autores para Latinoamérica. Teniendo en consideración que es una parasitosis que puede provocar la ceguera, se deberían planificar programas de prevención con el objetivo de disminuir su incidencia.

Causes and epidemiologic characteristics of uveitis in a public hospital of Buenos Aires

Objective. Uveitides are a group of diseases that differ according to the geographical region analyzed, therefore, it is critical to know the predominant etiologies of the environment involved. The goal of this paper is to analyze the most common causes and epidemiologic characteristics of uveitis cases coming to the Uveitis Service of "Santa Lucía" Ophthalmology Hospital of Buenos Aires, Argentina.

Methods. The database of patients attending the Uveitis Service for the first time between April 14 and October 6, 2016 was analyzed. For patient classification, the Standardization Uveitis Nomenclature (SUN) criteria were used.

Results. A total of 98 patients came for consultation, 12 were excluded from the sample because of missing data and also were other 5 who had been diagnosed with scleritis. Of the total 81 patients analyzed, 41 (50.6%) were women; the average age was 38 years (16-72). According to the anatomical classification, 36% were anterior uveitides, 4%, intermediate forms, 50%, posterior cases and 10%, panuveitides. Infectious uveitides were the most common ones, with 51.8%, and the most prevalent cause was toxoplasmosis, in 88% of cases. Within non-infectious uveitis, idiopathic anterior uveitis was the most frequent form found, in 64% of cases, followed by Vogt-Koyanagi-Harada, in 13% of cases.

Conclusion. Toxoplasmosis was the most common cause reported, as suggested by other authors, for Latin America. Since it is a parasitosis that may lead to blindness, prevention programs should be implemented with the purpose of reducing its incidence.

Causas e características epidemiológicas das uveítes em um hospital público de Buenos Aires

Objetivo. As uveítes são um grupo de doenças que diferem segundo a região geográfica analisada, por isso é muito importante conhecer as etiologias que predominam no médio. O objetivo deste trabalho é analisar as causas mais frequentes e características epidemiológicas das uveítes que consultam o Serviço de uveítes do Hospital Oftalmológico Santa Lucia de Buenos Aires, Argentina.

Métodos. Analisou-se o banco de dados de pacientes que consultaram por primeira vez o serviço de uveítes no período compreendido entre o dia 14 de abril e o dia 6 de outubro de 2016. Para sua classificação foram utilizados os critérios do SUN (*standardization uveitis nomenclature*).

Resultados. Um total de 98 pacientes foram consultados. Excluíram-se da análise 12 pacien-

tes por falta de dados e 5 pacientes que tinham diagnóstico de esclerite. Dos 81 pacientes analisados, 41 (50.6%) eram mulheres, a média de idade foi de 38 anos (16-72). Segundo a classificação anatômica, 36% corresponderam a uveítes anteriores, 4% a intermédias, 50% posteriores e 10% panuveíte. As uveítes infecciosas foram as mais frequentes com 51.8%, e a causa mais prevalente foi a toxoplasmose com 88% dos casos. Dentro das uveítes não infecciosas, a uveítis anterior idiopática foi a mais frequente com 64% seguida por Vogt Koyanagi Harada com 13%.

Conclusão. A toxoplasmose foi a causa mais frequente reportada como sugerem outros autores para a América Latina. Levando em consideração que é uma parasitose que pode provocar a cegueira, deveriam ser planejados programas de prevenção com o objetivo de diminuir sua incidência.

Rol del receptor purinérgico P2X7 en la regulación de la proliferación y diferenciación celular en la retina del zebrafish adulto

Medrano MP, Faillace MP

Instituto de Fisiología y Biofísica Bernardo Houssay (IFIBIO-Houssay), Universidad de Buenos Aires (UBA-CONICET).

medrano.matiasp@gmail.com

Introducción. A diferencia de los mamíferos, la retina de los peces teleósteos crece durante la vida adulta y se regenera luego de un daño. La regeneración se inicia cuando la glía de Müller recibe señales del microambiente dañado que inducen su reingreso al ciclo celular como progenitores retinales multipotentes. Se demostró en el laboratorio que el sistema purinérgico, en particular el ADP extracelular a través del P2Y1R, incrementa la proliferación celular de progenitores para la reparación y el crecimiento del tejido. Por otro lado, la activación prolongada del receptor purinérgico P2X7 participa en la génesis y/o la potenciación de patologías retinales en roedores.

Objetivo. Examinar los cambios a nivel morfológico y en la proliferación utilizando agonistas para el P2X7R en retinas de zebrafish sin lesionar.

Métodos. Se trataron retinas sin lesionar de zebrafish (*in vivo*) con agonistas (ATPγS o

BzATP) y/o un antagonista específico del P2X7R (A740003, 20 μ M).

Resultados. La inyección intraocular tanto de ATP γ S (1mM) como de BzATP (500 μ M) indujo aumentos significativos en la proliferación de células progenitoras retinales a los 4 días postinyección respecto de los ojos inyectados con vehículo. El ATP γ S indujo un incremento significativo exclusivamente del número de precursores proliferativos en la capa nuclear externa sin provocar cambios apreciables en la activación glial o la arquitectura retinal. Este efecto no fue bloqueado por el antagonista A740003. El BzATP, por otro lado, estimuló regeneración celular caracterizada por la presencia de *clusters* de células mitóticamente activas en la capa nuclear interna y un aumento de la expresión de GFAP en la glía de Müller. Estos efectos fueron inhibidos completamente por la coinyección del antagonista específico del P2X7R.

Conclusión. Los resultados indicaron la participación directa del P2X7R en la inducción de la injuria, principalmente en las capas externas, y la consecuente activación glial e inducción proliferativa de progenitores retinales para reparar el tejido. Las observaciones morfológicas sugieren que el P2X7R se expresaría principalmente en las capas externas. En contraste, el ATP γ S estimuló la división de precursores de los fotorreceptores bastones. Dicho efecto se podría deber a la activación de otro receptor purinérgico, como el P2Y1R, estimulando la generación de bastones durante el crecimiento de la retina de zebrafish.

Role of P2X7 purinergic receptor in the regulation of cell proliferation and differentiation in the retina of the adult zebrafish

Introduction. Unlike in mammals, the retina of teleost fish grows along adult life and regenerates when there is any damage. Regeneration begins when Müller glia receive signals from the damaged microenvironment inducing cell cycle re-entry as multipotent retinal progenitor cells. It has been demonstrated in the laboratory that the purinergic system, particularly extracellular ADP via P2Y1R, increases proliferation of progenitor

cells for tissue repair and growth. On the other hand, prolonged activation of the P2X7 purinergic receptor is involved in the genesis and/or potentiation of retinal disorders in rodents.

Objective. To examine changes occurring at the morphologic level and in proliferation using P2X7R agonists in uninjured zebrafish retinas.

Methods. Uninjured zebrafish retinas were treated (in vivo) with P2X7R agonists (ATP γ S or BzATP) and/or a specific P2X7R antagonist (A740003, 20 μ M).

Results. Both intraocular injections, of ATP γ S (1 mM) and BzATP (500 μ M), induced significant increases in progenitor retinal cell proliferation on day 4 postinjection vs. eyes injected with vehicle. ATP γ S induced a significant increase only in the number of proliferative precursor cells in the outer nuclear layer with no appreciable changes in glial activation or retinal architecture. This effect was not blocked by the A740003 antagonist. BzATP, on the other hand, stimulated cell regeneration characterized by the presence of mitotically active cell clusters in the inner nuclear layer, and an increase in GFAP expression in Müller glia. These effects were inhibited completely by co-injection of the specific P2X7R antagonist.

Conclusion. Results evidenced direct P2X7R involvement in injury induction, mainly in the outer layers, and the consequent glial activation and proliferative induction of retinal progenitor cells for tissue repair. The morphologic observations suggest that P2X7R might express mainly in the outer layers. In contrast, ATP γ S stimulated division of rod photoreceptor precursor cells. This effect might be due to activation of another purinergic receptor, such as P2Y1R, thereby stimulating rod generation during retinal growth in the zebrafish.

Função do receptor purinérgico P2X7 na regulação da proliferação e diferenciação celular na retina do zebrafish adulto

Introdução. A diferença dos mamíferos, a retina dos peixes teleósteos cresce durante a vida adulta e se regenera após um dano. A regeneração inicia quando a glia de Müller recebe sinais do micro-

ambiente danado que induzem seu reingresso ao ciclo celular como progenitores retiniais multipotentes. Demonstrou-se no laboratório que o sistema purinérgico, em particular o ADP extracelular através do P2Y1R, incrementa a proliferação celular de progenitores para a reparação e o crescimento do tecido. Por outro lado, a ativação prolongada do receptor purinérgico P2X7 participa na gênese e/ou a potenciação de patologias retiniais em roedores.

Objetivo. Examinar as mudanças em nível morfológico e na proliferação utilizando agonistas para o P2X7R em retinas de zebrafish sem lesar.

Métodos. Trataram-se retinas sem lesões de zebrafish (*in vivo*) com agonistas (ATP γ S o BzATP) e/ou um antagonista específico do P2X7R (A740003, 20 μ M).

Resultados. A injeção intraocular, tanto de ATP γ S (1mM) quanto de BzATP (500 μ M), induziu aumentos significativos na proliferação de células progenitoras retiniais aos 4 dias pós-injeção respeito dos olhos injetados com veículo. O ATP γ S induziu um incremento significativo exclusivamente do número de precursores proliferativos na camada nuclear externa sem provocar alterações apreciáveis na ativação glial ou a arquitetura retiniana. Este efeito não foi bloqueado pelo antagonista A740003. O BzATP, de outro lado, estimulou regeneração celular caracterizada pela presença de *clusters* de células mitoticamente ativas na camada nuclear interna e um aumento da expressão de GFAP na glía de Müller. Estes efeitos foram inibidos completamente pela co-injeção do antagonista específico do P2X7R.

Conclusão. Os resultados indicaram a participação direta do P2X7R na indução da injuria, principalmente nas externas, e a consequente ativação glial e indução proliferativa de progenitores retiniais para reparar o tecido. As observações morfológicas sugerem que o P2X7R se expressaria principalmente nas camadas externas. Em contraste, o ATP γ S estimulou a divisão de precursores dos fotorreceptores bastões. Esse efeito poderia ser devido à ativação de outro receptor purinérgico, como o P2Y1R, estimulando a geração de bastões durante o crescimento da retina de zebrafish.

El factor derivado del epitelio pigmentario (PEDF) previene la apoptosis y promueve la maduración de neuronas fotorreceptoras

Michelis G^a, Becerra SP^b, Germán L^a, Rotstein NP^a, Politi L^a
^a Instituto de Investigaciones Bioquímicas (INIBIB), Universidad Nacional del Sur (UNS-CONICET), Bahía Blanca, Argentina.
^b National Eye Institute (NEI), National Institutes of Health (NIH), Bethesda, Maryland, Estados Unidos.

Objetivos. El PEDF promueve la supervivencia de una línea R28 de precursores de retina y de neuronas fotorreceptoras *in vivo* en un modelo animal de neurodegeneración a través de la unión a su receptor PEDF-R. Un fragmento del PEDF (17-mer) contendría el sitio de unión a la región del PEDF-R importante para la neuroprotección. Se desconocen aún los mecanismos moleculares involucrados en esta protección y su posible rol en la diferenciación de fotorreceptores (FR) y neuronas amacrinas. Para investigarlos, en este trabajo analizamos los efectos del PEDF en la supervivencia y desarrollo de neuronas de retina *in vitro*.

Métodos. El PEDF recombinante humano se obtuvo del medio de cultivo de células BHK transformadas en forma estable con vectores de expresión conteniendo el cDNA para el PEDF completo. Cultivos neuronales obtenidos de retinas de rata de 1 día, en un medio químicamente definido, fueron tratados al día 2 con 10 nM PEDF, con PEDF más el péptido bloqueante P1 (sitio activo del PEDF-R) (100 nM), con el fragmento de PEDF 17-mer, o vehículo (control). A los 5 días de cultivo evaluamos la funcionalidad mitocondrial con la sonda Mitotracker, la supervivencia celular por técnicas de TUNEL e ioduro de propidio y el desarrollo de neuritas y expresión de opsina por ensayos inmunocitoquímicos seguidos de microscopia de fase.

Resultados. El PEDF redujo la apoptosis de los FR en un 60% respecto del control según los ensayos de TUNEL e incrementó de 20% a 50% los FR que preservaron su potencial de membrana mitocondrial. La preincubación con el péptido bloqueante P1 abolió estos efectos. El PEDF no aumentó la expresión de opsina, pero sí promovió su localización correcta en el cuerpo celular y procesos apicales en los FR, semejante a la observada en FR maduros, en contraste con la distribución difusa presente en los controles. El agregado del péptido 17-mer mimetizó los efectos del PEDF sobre la expresión de opsina.

Además, el PEDF aumentó la longitud de los axones en FR y neuronas amacrinas.

Conclusión. Estos resultados implican que el PEDF activaría mecanismos de supervivencia en los FR en cultivo y promovería distintos procesos de diferenciación en FR y neuronas amacrinas. También sugieren que el fragmento 17-mer sería capaz de activar la diferenciación en los FR, que involucraría al mismo sitio activo del PEDF-R.

Pigment epithelium-derived factor (PEDF) prevents apoptosis and promotes maturation of photoreceptor neurons

Objectives. PEDF promotes survival of a retinal precursor cell line, R28, and of photoreceptor neuron precursors in vivo in an animal neurodegeneration model by binding to its receptor (PEDF-R). A PEDF fragment (17-mer) is thought to contain a PEDF-R binding region important for neuroprotection. The molecular mechanisms involved in this protection and their possible role in photoreceptor (PR) and amacrine neuron differentiation are still unknown. To investigate this, we have analyzed the effects of PEDF on retinal neuron survival and development in vitro.

Methods. Recombinant human PEDF was obtained from a culture medium of BHK cells stably transformed into expression vectors containing cDNA for full-length PEDF. Neuronal cultures obtained from 1-day-old rats in a chemically-defined medium were treated on day 2 with 10 nM PEDF, with PEDF combined with the P1 blocking peptide (PEDF-R active site) (100 nM), with the PEDF fragment (17-mer) or with vehicle (control). After 5 days of culture we evaluated mitochondrial functionality with the MitoTracker probe, cell survival using TUNEL and propidium iodide techniques, and neurite development and opsin expression by immunocytochemistry assays followed by phase microscopy.

Results. PEDF reduced PR apoptosis by 60% vs. controls according to TUNEL assays, and increased from 20% to 50% the number of PRs preserving their mitochondrial membrane potential. Preincubation with the P1 blocking peptide abolished these effects. PEDF did not increase opsin expression but it did promote its correct localization in the cell body and

apical processes in PRs, similar to what occurs with mature PRs, in contrast with the diffuse distribution present in controls. Addition of the 17-mer peptide mimicked the effects of PEDF on opsin expression. Furthermore, PEDF increased axon length in PRs and amacrine neurons.

Conclusion. These results suggest that PEDF might activate survival mechanisms in cultured PRs and promote differentiation processes in PRs and amacrine neurons. They also suggest that the 17-mer fragment might be able to activate differentiation in PRs, with involvement of the same active site of the PEDF-R.

O fator derivado do epitélio pigmentar (PEDF) prevê a apoptose e promove a maturação de neurônios fotorreceptores

Objetivos. O PEDF promove a sobrevivência de uma linha R28 de precursores de retina e de neurônios fotorreceptores *in vivo* em um modelo animal de neurodegeneração através da união a seu receptor PEDF-R. Um fragmento do PEDF (17-mer) conteria o sitio de união à região do PEDF-R importante para a neuroproteção. Desconhecem-se ainda os mecanismos moleculares envolvidos nesta proteção e seu possível papel na diferenciação de fotorreceptores (FR) e neurônios amacrinos. Para pesquisar eles, neste trabalho analisamos os efeitos do PEDF na sobrevivência e desenvolvimento de neurônios de retina *in vitro*.

Métodos. O PEDF recombinante humano foi obtido do médio de cultura de células BHK transformadas em forma estável com vetores de expressão contendo o cDNA para o PEDF completo. Culturas neuronais obtidas de retinas de rato de 1 dia, em um médio quimicamente definido, foram tratados no dia 2 com 10 nM PEDF, com PEDF mais o péptido bloqueante P1 (sitio ativo del PEDF-R) (100 nM), com o fragmento de PEDF 17-mer, ou veículo (controle). Aos 5 dias de cultura avaliamos a funcionalidade mitocondrial com a sonda Mitotracker, a sobrevivência celular por técnicas de TUNEL e iodeto de propídio e o desenvolvimento de neuritas e expressão de opsina por ensaios imunocitoquímicos seguidos de microscopia de fase.

Resultados. O PEDF reduziu a apoptose dos FR em 60% respeito do controle segundo os ensaios

de TUNEL e incrementou de 20% a 50% os FR que preservaram seu potencial de membrana mitocondrial. A pré- incubação com o péptido bloqueante P1 aboliu esses efeitos. O PEDF não aumentou a expressão de opsina, mas sim promoveu sua localização correta no corpo celular e processos apicais nos FR, semelhante à observada em FR maduros, em contraste com a distribuição difusa presente nos controles. O agregado do péptido 17-mer mimetizou os efeitos do PEDF sobre a expressão de opsina. Além disso, o PEDF aumentou o comprimento dos axônios em FR e neurônios amacrinis.

Conclusão. Estes resultados implicam que o PEDF ativaria mecanismos de supervivência nos FR em cultura e promoveria distintos processos de diferenciação em FR e neurônios amacrinis. Também sugerem que o fragmento 17-mer seria capaz de ativar a diferenciação nos FR, que envolveria o mesmo sitio ativo do PEDF-R.

La simpatectomía cervical superior induce atrofia geográfica en ratones

Dieguez HH, Aranda ML, González Fleitas MF, Milne G, Rosenstein RE, Dorfman D.

Laboratorio de Neuroquímica Retiniana y Oftalmología Experimental, Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina (CEfyBO-CONICET), Universidad de Buenos Aires
her.die.14@gmail.com

Objetivos. La degeneración macular asociada con la edad (DMAE) es una de las principales causas de ceguera. La DMAE se clasifica en dos formas: húmeda o neovascular y seca o atrofia geográfica (AG). La AG se caracteriza por hipopigmentación del epitelio pigmentario retinal (EPR) y pérdida de fotorreceptores (FR) en un área localizada de la retina. Alteraciones del flujo coroideo se involucran en la patogénesis de la AG. Las terminales simpáticas provenientes del ganglio cervical superior (GCS) inervan los vasos coroideos y regulan su flujo. La gangliectomía cervical superior (GCSx) induce denervación simpática coroidea completa e irreversible. El objetivo de este trabajo fue analizar el efecto de la GCSx sobre la retina externa y el EPR en ratones.

Métodos. Se realizó una GCSx unilateral en ratones C57/BL6 adultos mientras que en el lado contralateral se realizaba un procedimiento simu-

lado. A las 4, 6, y 10 semanas pos-GCSx se evaluó la función retinal (electrorretinograma, ERG) y se analizó el contenido de melanina en el EPR, los niveles de RPE65 (inmunohistoquímica), la apoptosis de FR y EPR (método de TUNEL) y la ultraestructura de la coroides, membrana de Bruch, EPR y FR (por microscopía electrónica).

Resultados. A las cuatro semanas poscirugía, la GCSx provocó una disfunción retinal y una disminución en el contenido de melanina del EPR en la retina temporal (pero no nasal), que progresó luego de 6 y 10 semanas. A partir de la cuarta semana pos-GCSx se observó una disminución significativa en los niveles de RPE65 exclusivamente en la retina temporal. A las 10 semanas luego de la cirugía, se observaron células TUNEL(+) en la capa de FR y el EPR en la retina temporal. Luego de 4 semanas, la GCSx indujo un aumento en el espesor de la coriocapilaris nasal y temporal, en tanto que a las 10 semanas poscirugía se observó un aumento en el espesor de la membrana de Bruch, alteraciones morfológicas en el EPR y FR exclusivamente en la retina temporal. No se observaron diferencias entre animales intactos y con procedimiento simulado en ningún parámetro.

Conclusiones. Estos resultados demuestran que la GCSx induce cambios compatibles con la AG en la retina del ratón.

Superior cervical sympathectomy induces geographic atrophy in mice

Objectives. Age-related macular degeneration (ARMD) is one of the main causes of blindness. ARMD is classified into two groups: wet or neovascular or dry or geographic atrophy (GA). GA is characterized by retinal pigment epithelium (RPE) hypopigmentation and photoreceptor (PR) loss in a localized area of the retina. Choroidal flow disturbances have been involved in the pathogenesis of GA. Sympathetic terminals coming from the superior cervical ganglion (SCG) innervate choroidal vessels and regulate their flow. Superior cervical ganglionectomy (SCGx) induces complete and irreversible sympathetic denervation of the choroid. The goal of this paper was to analyze the effect of SCGx on the outer retina and RPE in mice.

Methods. A unilateral SCGx was performed on adult C57/BL6 mice, while the contralateral side underwent a simulated procedure. Retinal function (electroretinogram, ERG), melanin content in the RPE, RPE65 (immunohistochemistry), PR and RPE apoptosis (TUNEL technique) and choroid, Bruch's membrane and RPE and PR ultrastructure (electron microscopy) were analyzed 4, 6 and 10 weeks after SCGx.

Results. Four weeks after surgery, SCGx produced retinal dysfunction and a decrease in the melanin content of the RPE in the temporal (though not in the nasal) retina that had progressed after 6 and 10 weeks. As from week 4 post-SCGx there was a significant reduction in RPE65 levels only in the temporal retina. Ten weeks after surgery, TUNEL-positive cells were observed on the PR and RPE layer in the temporal retina. After 4 weeks, SCGx induced an increase in the nasal and temporal choriocapillaris, while after 10 weeks of the procedure there was increased thickness of Bruch's membrane, and morphologic RPE and PR changes only in the temporal retina. No differences between intact animals and those undergoing the simulated procedure were observed in any of the parameters evaluated.

Conclusions. These results demonstrate that SCGx induces changes compatible with GA in mice retinas.

A simpatectomia cervical superior induz atrofia geográfica em ratos

Objetivos. A degeneração macular associada com a idade (DMAE) é uma das principais causas de cegueira. A DMAE se classifica em duas formas: úmida ou neovascular e seca ou atrofia geográfica (AG). A AG se caracteriza por hipopigmentação do epitélio pigmentar retinal (EPR) e perda de fotorreceptores (FR) em uma área localizada da retina. Alterações do fluxo coroídeo envolveram-se na patogênese da AG. Os terminais simpáticos provenientes do gânglio cervical superior (GCS) inervam os vasos coroídeos e regulam seu fluxo. A gangliectomia cervical superior (GCSx) induz denervação simpática coroídea completa e irrever-

sível. O objetivo deste trabalho foi analisar o efeito da GCSx sobre a retina externa e o EPR em ratos.

Métodos. Realizou-se uma GCSx unilateral em ratos C57/BL6 adultos enquanto no lado contralateral se realizava um procedimento simulado. As 4, 6, e 10 semanas pós-GCSx se avaliou a função retiniana (eletroretinograma, ERG) e se analisou o conteúdo de melanina no EPR, os níveis de RPE65 (imunohistoquímica), a apoptose de FR e EPR (método de TUNEL) e a ultraestrutura da coróide, membrana de Bruch, EPR e FR (por microscopia eletrônica).

Resultados. Às quatro semanas pós-cirurgia, a GCSx provocou uma disfunção retiniana e uma diminuição no conteúdo de melanina do EPR na retina temporal (mas não nasal), que progrediu após 6 e 10 semanas. A partir da quarta semana pós-GCSx se observou uma diminuição significativa nos níveis de RPE65 exclusivamente na retina temporal. Às 10 semanas após a cirurgia, observaram-se células TUNEL(+) na camada de FR e o EPR na retina temporal. Após 4 semanas, a GCSx induziu um aumento na espessura da coriocapilaris nasal e temporal, enquanto às 10 semanas pós-cirurgia se observou um aumento na espessura da membrana de Bruch, alterações morfológicas no EPR e FR exclusivamente na retina temporal. Não se observaram diferenças entre animais intactos e com procedimento simulado em nenhum parâmetro.

Conclusões. Estes resultados demonstram que a GCSx induz alterações compatíveis com a AG na retina do rato.

Establecimiento de líneas celulares derivadas de pacientes con retinoblastoma metastásico como herramienta para la investigación traslacional

Zugbi S^a, Winter U^{ae}, Aschero MR^b, Torbidoni A^{ac}, Cafferata E^{ec}, Podhajcer O^{ec}, Chantada G^d, Schaiquevich P^{ae}

^aUnidad de Farmacocinética Clínica, Hospital de Pediatría Juan P. Garrahan, Buenos Aires.

^bServicio de Patología, Hospital de Pediatría Juan P. Garrahan, Buenos Aires.

^cLaboratorio de Terapia Molecular y Celular, Fundación Instituto Leloir, Buenos Aires.

^dServicio de Hematooncología, Hospital de Pediatría Juan P. Garrahan, Buenos Aires.

^eConsejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) Buenos Aires.

santiagozugbi@gmail.com

Objetivos. Establecer modelos de estudio *in vitro* de retinoblastoma metastásico y evaluar sensibilidad de las células tumorales.

Métodos. Las muestras se obtuvieron de tumor de ganglios linfáticos de un paciente con retinoblastoma metastásico durante la progresión de la enfermedad (LNP) y la autopsia (LNA) en el Hospital de Pediatría J. P Garrahan, bajo la aprobación de un protocolo de ética. Las muestras de tumor de los pacientes se inocularon por vía subcutánea en ratones atímicos nude. Luego de evidenciar el crecimiento tumoral, se removieron y procesaron los tumores para obtener el cultivo celular. Una vez establecido el cultivo utilizando un medio para células pluripotenciales, se cultivaron células/well y se expusieron a concentraciones crecientes de melfalan (0.01-327.5 μM) para evaluar la sensibilidad a quimioterapia. La viabilidad celular se valoró utilizando MTT. La concentración de melfalan que causa un 50% de muerte celular (IC50%) se calculó y comparó con resultados previamente obtenidos de líneas celulares comerciales (WERI-Rb1) y respecto de células obtenidas de pacientes no metastásicos, sin tratamiento previo (HSJD-RBT-7) o multitratado (HSJD-RBT-8).

Resultados. Las líneas celulares primarias de retinoblastoma metastásico se establecieron para ambas muestras (LNP y LNA). Ambas crecieron en forma de neuroesferas típicas y resultaron positivas para el marcador molecular CRX (cone-rod homeobox). La mediana (rango) de IC50% de melfalan para LNP y LNA fue 78.7 μM (105.7-53.8) y 89.6 μM (95.7-69.6), respectivamente ($p > 0.05$). Las IC50 de melfalan obtenidas fueron significativamente mayores a aquellas alcanzadas en las líneas comerciales (WERI-RB1: 11.9 μM) y en las líneas celulares derivadas de pacientes no-metastásicos (007: 0.3 μM ; 008: 4.9 μM) ($p < 0.05$).

Conclusión. Se logró obtener las líneas celulares primarias de tumores metastásicos. Estas fueron caracterizadas en base a su sensibilidad farmacológica, siendo su IC50 significativamente mayor en comparación con la línea comercial y de pacientes no-metastásicos. Este modelo *in-vitro* podría tener un impacto directo en la investigación traslacional de retinoblastoma.

Establishing cell lines derived from patients with metastatic retinoblastoma as a tool for translational investigation

Objectives. To establish *in vitro* metastatic retinoblastoma study models and to evaluate the sensitivity of tumor cells.

Methods. Samples were obtained from lymph node tumors from a patient with metastatic retinoblastoma during progression of the disease (LNP) and autopsy (LNA) at "J.P. Garrahan" Children Hospital, according to the rules of an ethics protocol. Tumor samples from patients were inoculated subcutaneously to athymic nude mice. After evidencing tumor growth, tumors were removed and processed to obtain the cell culture. Once the culture was established by using a medium for pluripotent cells, cells/well were cultured and exposed to increasing melphalan concentrations (0.01-327.5 μM) in order to evaluate sensitivity to chemotherapy. Cell viability was appraised using MTT. Melphalan concentration causing a 50% cell death (IC50) was estimated and compared to results previously obtained from commercial cell lines (WERI-Rb1) and vs. cells obtained from non-metastatic treatment-naïve (HSJD-RBT-7) or multitrated (HSJD-RBT-8) patients.

Results. Primary metastatic retinoblastoma cell lines were established for both samples (LNP and LNA). In both cases they grew in the typical neurosphere shape and turned out positive for the molecular marker CRX (cone-rod homeobox). The median (range) IC50 of melphalan for LNP and LNA was 78.7 μM (105.7- 53.8) and 89.6 μM (95.7- 69.6), respectively ($p > 0.05$). The IC50s obtained for melphalan were significantly higher than those found with commercial lines (WERI-RB1: 11.9 μM) and with cell lines derived from non-metastatic patients (007: 0.3 μM ; 008: 4.9 μM) ($p < 0.05$).

Conclusion. Primary metastatic tumor cell lines were achieved. These lines were characterized on the basis of their pharmacologic sensitivity, with significantly higher IC50 vs. the commercial line and that obtained from non-metastatic patients. This *in vitro* model might have a direct impact on retinoblastoma translational investigation.

Estabelecimento de linhas celulares derivadas de pacientes com retinoblastoma metastático como ferramenta para a pesquisa translacional

Objetivos. Estabelecer modelos de estudo *in vitro* de retinoblastoma metastático e avaliar sensibilidade das células tumorais.

Métodos. As mostras foram obtidas de tumor de gânglios linfáticos de um paciente com retinoblastoma metastático durante a progressão da doença (LNP) e a autopsia (LNA) no Hospital de Pediatria J. P. Garrahan, sob a aprovação de um protocolo de ética. As amostras de tumor dos pacientes foram inoculadas por via subcutânea em ratos nude atímicos. Depois de evidenciar o crescimento tumoral, removeram-se e processaram-se os tumores para obter a cultura celular. Uma vez estabelecida a cultura utilizando um meio para células pluripotenciais, cultivaram-se células/well e foram expostas a concentrações crescentes de melfalan (0.01-327.5 μM) para avaliar a sensibilidade à quimioterapia. A viabilidade celular se valorou utilizando MTT. A concentração de melfalan que causa 50% de morte celular (IC50%) calculou-se e foi comparada com resultados previamente obtidos de linhas celulares comerciais (WERI-Rb1) a respeito de células obtidas de pacientes não metastáticos, sem tratamento prévio (HSJD-RBT-7) ou multi-tratado (HSJD-RBT-8).

Resultados. As linhas celulares primárias de retinoblastoma metastático se estabeleceram para ambas as amostras (LNP y LNA). Ambas as amostras cresceram de forma de neuroesferas típicas e resultaram positivas para o marcador molecular CRX (cone-rod homeobox). A média (faixa) de IC50% de melfalan para LNP e LNA foi 78.7 μM (105.7-53.8) e 89.6 μM (95.7-69.6), respectivamente ($p > 0.05$). As IC50 de melfalan obtidas foram significativamente maiores a aquelas alcançadas nas linhas comerciais (WERI-RB1: 11.9 μM) e nas linhas celulares derivadas de pacientes não-metastáticos (007: 0.3 μM ; 008: 4.9 μM) ($p < 0.05$).

Conclusão. Conseguiu-se obter as linhas celulares primárias de tumores metastáticos. Elas foram caracterizadas com base em sua sensibilidade farmacológica, sendo seu IC50 significa-

tivamente maior em comparação com a linha comercial e de pacientes não-metastáticos. Este modelo *in-vitro* poderia ter um impacto direto na pesquisa translacional de retinoblastoma.

Evaluación *in vitro* e *in vivo* de dos esquemas terapéuticos de quimioterapia en retinoblastoma

Winter U^{ac}, Pascual-Pasto G^b, Mena A^{ac}, Soledad N^{ac}, Suñol M^d, Guillermo C^{ac}, Montero Carcaboso A^b, Schaiquevich P^{ac}
^a Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Buenos Aires.

^b Fundación Sant Joan de Deu, Barcelona, España.

^c Instituto de Medicina Experimental, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires.

^d Hospital Sant Joan de Deu, Barcelona, España.

^e Hospital de Pediatría Prof. Dr. Juan P. Garrahan, Buenos Aires. winter.u.a@gmail.com

Objetivo. La estrategia actual de administración de quimioterapia en retinoblastoma corresponde a la dosis máxima tolerada. Un esquema alternativo es el tratamiento metronómico. Este esquema puede ayudar a disminuir la incidencia de efectos adversos por el uso de bajas dosis. Nuestro objetivo fue evaluar el efecto citotóxico y antiangiogénico de estos dos esquemas de quimioterapia utilizando modelos *in vivo* e *in vitro* en retinoblastoma.

Material. Se utilizaron dos modelos celulares derivados de pacientes con retinoblastoma (HSDJ-RBT-7 y HSJD-RBT-8) y dos líneas celulares endoteliales humanas (HUVEC y EPC) que se expusieron a concentraciones crecientes de melfalan o topotecan bajo una dosis única (convencional) o bajo un esquema de exposición continua por 7 días (metronómico). Se determinó la concentración capaz de inhibir un 50% la viabilidad celular por medio de MTT. El efecto de los diferentes esquemas de tratamiento sobre las células endoteliales se evaluó por la capacidad de formación de tubos usando el ensayo de Matrigel. También se evaluó la respuesta *in vivo* de la administración de topotecan bajo un esquema convencional o metronómico utilizando un modelo de xenoinjerto murino de retinoblastoma. Se comparó la densidad vascular de los tumores después de tratamientos con CD31.

Resultados. El melfalan y el topotecan ejercen un efecto citotóxico en los modelos de retinoblastoma y en las líneas celulares endoteliales humanas bajo los dos esquemas de tratamiento. Se observó una reducción significativa de la IC50 de melfalan y topotecan, respecto del tratamiento convencional, en HUVEC, EPC y HSJD-RBT-8 ($p < 0,05$); sin embargo no hubo cambio en la sensibilidad en el modelo celular de retinoblastoma HSJD-RBT-7 ($p > 0,05$).

Conclusiones. Ambos quimioterápicos, topotecan y melfalan, inhibieron significativamente la formación de tubos *in vitro* respecto del tratamiento convencional, en HUVEC y EPC ($p < 0,05$). En el modelo murino se observó una reducción significativa en el volumen tumoral de los animales tratados bajo un esquema metronómico en comparación a los de un esquema convencional ($p < 0,05$). A su vez, la expresión de CD31 fue más baja después del tratamiento metronómico en comparación con el tratamiento convencional ($p < 0,05$). Proponemos que la quimioterapia metronómica puede ser una opción válida para el tratamiento del retinoblastoma basado en el efecto citotóxico y antiangiogénico observado.

In vitro and in vivo evaluation of two chemotherapy schemes in retinoblastoma

Objective. The current strategy of chemotherapy administration in retinoblastoma involves the maximum tolerated dose. An alternative scheme is metronomic therapy. This can help reduce the incidence of adverse events because of the use of low doses. Our goal was to evaluate the cytotoxic and antiangiogenic effect of these two chemotherapy schemes using in vivo and in vitro retinoblastoma models.

Material. Two cell models derived from retinoblastoma patients (HSDJ-RBT-7 and HSJD-RBT-8) and two human endothelial cell lines (HUVEC and EPC) exposed to increasing melfalan or topotecan concentrations as a single dose (conventional) or to a 7-day-continuous exposure scheme (metronomic) were used. The concentration that was able to inhibit 50% of

cell viability was determined using MTT. The effect of the different therapeutic schemes on endothelial cells was evaluated according to their tube formation ability using the Matrigel assay. The in vivo response of topotecan administration according to a conventional or metronomic scheme was also assessed using a xenograft murine model of retinoblastoma. Tumor vascular density was compared after CD31 treatments.

Results. Melphalan and topotecan exert a cytotoxic effect on retinoblastoma models and on human endothelial cell lines treated with both schemes. There was a significant reduction in the IC50 of melphalan and topotecan vs. conventional treatment in HUVEC, EPC and HSJD-RBT-8 ($p < 0.05$); however, no sensitivity changes were observed in the retinoblastoma cell model HSJD-RBT-7 ($p > 0.05$).

Conclusions. Both chemotherapy agents, melphalan and topotecan, inhibited in vitro tube formation significantly vs. conventional therapy in HUVEC and EPC ($p < 0.05$). In the murine model there was a significant reduction in the tumor volume of animals treated with the metronomic scheme vs. the conventional one ($p < 0.05$). Furthermore, CD31 expression was lower after metronomic treatment vs. conventional therapy ($p < 0.05$). In our opinion, metronomic chemotherapy might be a valid option for treating retinoblastoma on the basis of the cytotoxic and antiangiogenic effect observed.

Avaliação *in vitro* e *in vivo* de dois esquemas terapêuticos de quimioterapia em retinoblastoma

Objetivo. A estratégia atual de administração de quimioterapia em retinoblastoma corresponde à dose máxima tolerada. Um esquema alternativo é o tratamento metronômico. Este esquema pode ajudar a diminuir a incidência de efeitos adversos pelo uso de baixas doses. Nosso objetivo foi avaliar o efeito citotóxico e antiangiogênico destes dois esquemas de quimioterapia utilizando modelos *in vivo* e *in vitro* em retinoblastoma.

Material. Utilizaram-se dois modelos celulares derivados de pacientes com retinoblastoma (HSDJ-RBT-7 e HSJD-RBT-8) e duas linhas celulares endoteliais humanas (HUVEC e EPC) que se expuseram a concentrações crescentes de melfalan ou topotecan sob uma dose única (convencional) ou sob um esquema de exposição contínua por 7 dias (metronômico). Determinou-se a concentração capaz de inibir 50% a viabilidade celular mediante MTT. O efeito dos diferentes esquemas de tratamento sobre as células endoteliais foi avaliado pela capacidade de formação de tubos usando o ensaio de Matrigel. Também avaliou-se a resposta *in vivo* da administração de topotecan sob um esquema convencional ou metronômico utilizando um modelo de xenoinjerto murino de retinoblastoma. Comparou-se a densidade vascular dos tumores depois de tratamentos com CD31.

Resultados. O melfalan e o topotecan exercem um efeito citotóxico nos modelos de retinoblastoma e nas linhas celulares endoteliais humanas sob os dois esquemas de tratamento. Observou-se uma redução significativa da IC50 de melfalan e topotecan, respeito do tratamento convencional, em HUVEC, EPC e HSJD-RBT-8 ($p < 0,05$); porém não houve alterações na sensibilidade no modelo celular de retinoblastoma HSJD-RBT-7 ($p > 0,05$).

Conclusões. Ambos os quimioterápicos, topotecan e melfalan, inibiram significativamente a formação de tubos *in vitro* respeito do tratamento convencional, em HUVEC e EPC ($p < 0,05$). No modelo murino se observou uma redução significativa no volume tumoral dos animais tratados sob um esquema metronômico em comparação aos de um esquema convencional ($p < 0,05$). Por sua vez, a expressão de CD31 foi menor depois do tratamento metronômico em comparação com o tratamento convencional ($p < 0,05$). Propomos que a quimioterapia metronômica pode ser uma opção válida para o tratamento do retinoblastoma baseado no efeito citotóxico e antiangiogênico observado.

Asociación de variantes genéticas y retinopatía diabética proliferativa en una población argentina de pacientes diabéticos tipo II

Yang P^a, Sein A^b, Aucar E^b, Gramajo AL^b, Alcoba E^b, Márquez GE^b, Juárez Beltrán GP^b, Beltramo DM^{bc}, Soria NW^a, Luna Pinto JD^b

^a Cátedra de Biotecnología, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Católica de Córdoba. Unidad Asociada al CONICET, Córdoba, Argentina.

^b Centro Privado de Ojos Romagosa, Fundación VER, Córdoba, Argentina

^c Centro de Excelencia en Productos y Procesos (CEPROCOR), Santa María de Punilla, Córdoba, Argentina.

fundacionver@gmail.com

Objetivos. Investigar si la presencia de siete polimorfismos en seis genes candidatos se encuentran asociados con la retinopatía diabética proliferativa (RDP) en una cohorte de pacientes argentinos con diabetes mellitus tipo 2 (DM2).

Métodos. Se estudiaron 231 pacientes (126 con RDP y 105 sin RDP) no relacionados, diagnosticados con DM2 y asistidos en la Clínica de Ojos Romagosa. Se evaluaron parámetros antropométricos y oftalmológicos. Se dosaron los niveles de glucemia, HbA1c y perfil lipídico. Se registró si eran fumadores, tipo de tratamiento farmacológico recibido, presión arterial, años de duración de la patología y presencia/ausencia de edema macular. Posteriormente, se analizó — mediante la técnica de PCR-RFLP— la presencia de los polimorfismos MTHFR (rs1801133), bFGF (553 T/A), CDKAL1 (rs4712527), VEGF (rs699947, rs35569394), TCF7L2 (rs7903146) y ECA (rs4646994).

Resultados. La presencia del polimorfismo rs4712527 del gen CDKAL1 confiere menor riesgo a desarrollar retinopatía diabética proliferativa (OR = 0,34, IC del 95% = 0,13-0,87; P=0,022). Los polimorfismos MTHFR (rs1801133), bFGF (553 T/A), VEGF (rs699947, rs35569394), TCF7L2 (rs7903146) y ECA (rs4646994) no presentaron diferencias significativas.

Conclusiones. El presente estudio muestra por primera vez la asociación entre la presencia del polimorfismo G del rs4712527 en el gen CDKAL1 como factor protector a la hora de desarrollar retinopatía diabética proliferativa en pacientes

argentinos con DM2. No se ha encontrado la misma asociación con los otros polimorfismos estudiados.

Association of genetic variants and proliferative diabetic retinopathy in an Argentinian population of type 2 diabetes mellitus patients

Objectives. To investigate whether the presence of seven polymorphisms in six candidate genes is associated with proliferative diabetic retinopathy (PDR) in a cohort of Argentinian patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM).

Methods. A total of 231 unrelated patients (126 with PDR and 105 with no PDR) diagnosed with T2DM and attending the “Romagosa” Eye Clinic was studied. Anthropometric and ophthalmologic parameters were evaluated. Glucose levels were measured, as well as HbA1c and lipid profile. Smoking status, type of pharmacotherapy received, blood pressure values, duration of the disease in years and presence/absence of macular edema were recorded. Presence of MTHFR (rs1801133), bFGF (-553 T/A), CDKAL1 (rs4712527), VEGF (rs699947, rs35569394), TCF7L2 (rs7903146) and ACE (rs4646994) polymorphisms was then analyzed using PCR-RFLP.

Results. Presence of CDKAL1 gene (rs4712527) polymorphism lowers the risk of developing proliferative diabetic retinopathy (OR= 0.34; 95% CI= 0.13 – 0.87; p= 0.022). MTHFR (rs1801133), bFGF (-553 T/A), VEGF (rs699947, rs35569394), TCF7L2 (rs7903146) and ACE (rs4646994) polymorphisms failed to show significant differences.

Conclusions. This study is the first to evidence the association between presence of G polymorphism of the CDKAL1 gene (rs4712527 [G]) as a protective factor against development of proliferative diabetic retinopathy in Argentinian patients with T2DM; however, the other polymorphisms studied failed to show the same association.

Associação de variantes genéticas e retinopatia diabética proliferativa em uma população argentina de pacientes diabéticos tipo II

Objetivos. Pesquisar se a presença de sete polimorfismos em seis genes candidatos se encontram associados com a retinopatia diabética proliferativa (RDP) em uma coorte de pacientes argentinos com diabetes mellitus tipo 2 (DM2).

Métodos. Estudaram-se 231 pacientes (126 com RDP e 105 sem RDP) não relacionados, diagnosticados com DM2 e assistidos na Clínica de Olhos Romagosa. Avaliaram-se parâmetros antropométricos e oftalmológicos. Dosaram-se os níveis de glicemia, HbA1c e perfil lipídico. Registrou-se se eram fumadores, tipo de tratamento farmacológico recebido, pressão arterial, anos de duração da patologia e presença/ausência de edema macular. Posteriormente, analisou-se —mediante a técnica de PCR-RFLP— a presença dos polimorfismos MTHFR (rs1801133), bFGF (553 T/A), CDKAL1 (rs4712527), VEGF (rs699947, rs35569394), TCF7L2 (rs7903146) e ECA (rs4646994).

Resultados. A presença do polimorfismo rs4712527 del gen CDKAL1 confere menor risco de desenvolver retinopatia diabética proliferativa (OR = 0,34, IC del 95% = 0,13-0,87; P=0,022). Os polimorfismos MTHFR (rs1801133), bFGF (553 T/A), VEGF (rs699947, rs35569394), TCF7L2 (rs7903146) y ECA (rs4646994) não apresentaram diferenças significativas.

Conclusões. O presente estudo mostra, pela primeira vez, a associação entre a presença do polimorfismo G do rs4712527 no gene CDKAL1 como fator protetivo na hora de desenvolver retinopatia diabética proliferativa em pacientes argentinos com DM2. Não foi encontrada a mesma associação com os outros polimorfismos estudados.

Las células madre gliales de Müller disminuyen su potencial regenerativo y presentan alteraciones estructurales durante la degeneración de la retina en ratones *rd*

Volonté YV, German OL, Dibo MJ, Ayala Peña VB, Garelli A, Rotstein NP, Politi LE.

Instituto de Investigaciones Bioquímicas, Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional del Sur-CONICET, Bahía Blanca, Argentina.

yvolonte@criba.edu.ar

Objetivos. En la retinitis pigmentosa (RP) las neuronas fotorreceptoras (FR) mueren selectivamente por apoptosis causando la pérdida progresiva e irreversible de la visión. Una estrategia prometedora para lograr un tratamiento más efectivo o eventualmente su cura es la regeneración de los FR eliminados utilizando células gliales de Müller (CGM), consideradas células madre. Sin embargo, en los mamíferos las CGM no regeneran los FR ni en la RP ni en su modelo animal —los ratones *rd*— portadores de una degeneración similar a la RP. Las causas de esta incapacidad, el rol de las CGM y sus posibles alteraciones en esta patología están aún inexplorados. Nuestra hipótesis es que la degeneración de los FR en estas enfermedades alteraría el “diálogo” neuroglial requerido para el normal funcionamiento de las CGM. El objetivo de este trabajo fue analizar si las CGM se ven afectadas en su estructura y potencial regenerativo durante la degeneración en la retina *rd*.

Métodos. Se realizaron cultivos mixtos neurogliales de retinas de ratones *wt* y *rd* de dos días postnatal (PN), co-cultivos de neuronas *rd* y CGM *wt*, o neuronas *wt* y CGM *rd*, y cortes histológicos de estas retinas a distintos días PN. En los cultivos la muerte neuronal se analizó por ensayo de TUNEL y los niveles de la proteína pro-apoptótica BAX por PCR. Se investigó la expresión de nestina, marcador de células madre, por inmunocitoquímica y qRT-PCR en cultivos gliales puros, cultivos mixtos neurogliales, co-cultivos neurogliales y muestras de retina entera.

Resultados. El porcentaje de neuronas TUNEL-positivas fue mayor en cultivos *rd* que en los *wt*, lo que se correlacionó con una mayor transcripción de Bax en neuronas *rd*. La expresión de nestina en las CGM *rd* en cultivos mixtos fue menor que en los *wt*. En retinas enteras, el ARNm de nestina

mostró un pico al día PN4, menor en retinas *rd* que en las *wt*. Los cortes histológicos revelaron alteraciones estructurales en las CGM *rd* incluyendo varicosidades y engrosamientos a la altura de la capa de células ganglionares y pérdida de la expresión de nestina. La co-incubación de CGM *rd* con neuronas *wt* aumentó la expresión de nestina y de su ARNm en las CGM *rd*, sugiriendo que la interacción de las CGM con los FR podría regular su potencial regenerativo.

Conclusión. Estos resultados muestran alteraciones estructurales en las CGM *rd* y una disminución en su expresión de nestina y sugieren que la degeneración de los FRs *rd* alteraría el “diálogo” de los FR con las CGM, afectando su capacidad regenerativa.

Müller glial mother cells reduce their regenerative potential and show structural changes during retinal degeneration in *rd* mice

Objectives. In retinitis pigmentosa (RP) photoreceptor (PR) neurons die selectively by apoptosis, causing progressive and irreversible visual loss. A promising strategy to achieve a more effective treatment or eventually its cure involves regeneration of the PRs lost using Müller glial cells (MGCs), considered as stem cells. However, in mammals, MGCs do not regenerate PRs in RP nor in its animal model —*rd* mice— with a similar degeneration to that occurring in RP. The causes of this inability, the role of MGCs and their possible disturbances in this disease still remain to be elucidated. We hypothesize that PR degeneration in these diseases might disturb the neuro-glial “dialogue” required for normal MGC functioning. The goal of this paper was to analyze whether MGCs are affected in their structure and regenerative potential during degeneration in *rd* retinas.

Methods. Mixed neuroglial cultures from the retinas of 2-day-old *wt* and *rd* mice (postnatal day 2: PN2), co-cultures of *rd* neurons and *wt* MGCs or of *wt* neurons and *rd* MGCs, and histology slides of these retinas on different PN days were prepared. In cultures, neuronal death was analyzed using TUNEL assay, and pro-apoptotic

protein BAX levels, by PCR. Nestin expression, a stem cell marker, was investigated by immunocytochemistry and qRT-PCR in pure glial cultures, neuroglial mixed cultures, neuroglial co-cultures and in whole-retina samples.

Results. The percentage of TUNEL-positive neurons was higher in *rd* cultures than in *wt* ones, and this correlated with a greater BAX transcription in *rd* neurons. Nestin expression in *rd* MGCs in mixed cultures was lower than in *wt* ones. In whole retinas, nestin mRNA showed a peak at PN4, lower in *rd* retinas than in *wt* ones. Histology slides revealed structural disturbances in *rd* MGCs, including varicosities and thickenings at the level of the ganglion cell layer, and nestin expression loss. Co-incubation of *rd* MGCs with *wt* neurons increased the expression of nestin and of its mRNA in *rd* MGCs, thus suggesting that interaction of MGCs with PRs might regulate their regenerative potential.

Conclusion. These results evidence structural changes in *rd* MGCs and a decrease in nestin expression, and suggest that *rd* PR degeneration might disturb the “dialogue” of PRs with MGCs, thereby affecting their regenerative ability.

As células-tronco gliais de Müller diminuem seu potencial regenerativo e apresentam alterações estruturais durante a degeneração da retina em ratos *rd*

Objetivos. Na retinite pigmentosa (RP) os neurônios fotorreceptores (FR) morrem seletivamente por apoptose causando a perda progressiva e irreversível da visão. Uma estratégia prometedora para conseguir um tratamento mais efetivo ou eventualmente sua cura é a regeneração dos FR eliminados utilizando células gliais de Müller (CGM), consideradas células-tronco. No entanto, nos mamíferos, as CGM não regeneram os FR nem na RP nem em seu modelo animal —os ratos *rd*— portadores de uma degeneração semelhante à RP. As causas desta incapacidade, o papel das CGM e suas possíveis alterações nesta patologia estão ainda inexplorados. Nossa hipótese é que a degeneração dos FR nestas doenças alteraria o “diálogo” neuroglial requerido para o normal funcionamento das CGM. O objetivo deste tra-

balho foi analisar se as CGM são acometidas em sua estrutura e potencial regenerativo durante a degeneração na retina *rd*.

Métodos. Realizaram-se culturas mistas neurogliais de retinas de ratos *wt* e *rd* de dois dias pós-natal (PN), co-culturas de neurônios *rd* e CGM *wt*, ou neurônios *wt* e CGM *rd*, e cortes histológicos destas retinas em diferentes dias PN. Nas culturas a morte neuronal foi analisada por ensaio de TUNEL e os níveis da proteína pró-apoptótica BAX por PCR. Pesquisou-se a expressão de nestina, marcador de células-tronco, por imunocitoquímica e qRT-PCR em culturas gliais puras, culturas mistas neurogliais, co-culturas neurogliais e amostras de retina inteira.

Resultados. A porcentagem de neurônios TUNEL-positivos foi maior em culturas *rd* que nos *wt*, o que se correlacionou com uma maior transcrição de Bax em neurônios *rd*. A expressão de nestina nas CGM *rd* em culturas mistas foi menor que nos *wt*. Em retinas inteiras, o ARNm de nestina mostrou um tope no dia PN4, menor em retinas *rd* que nas *wt*. Os cortes histológicos revelaram alterações estruturais nas CGM *rd* incluindo varicosidades e engrossamentos à altura da camada de células ganglionares e perda da expressão de nestina.

A co-incubação de CGM *rd* com neurônios *wt* aumentou a expressão de nestina e de seu ARNm nas CGM *rd*, sugerindo que a interação das CGM com os FR poderia regular seu potencial regenerativo.

Conclusão. Estes resultados mostram alterações estruturais nas CGM *rd* e uma diminuição em sua expressão de nestina e sugerem que a degeneração dos FRs *rd* alteraria o “diálogo” dos FR com as CGM, afetando sua capacidade regenerativa.

Desarrollo de un modelo experimental de glaucoma felino

Iaquinandí A, Alvarez J y Sande PH.

Laboratorio de Neuroquímica Retiniana y Oftalmología Experimental, Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires (CEFYBO-CONICET), Buenos Aires.

p_sande@yahoo.com

Objetivos. El glaucoma felino representa un desafío terapéutico en oftalmología veterina-

ria. Aunque existen varias características comunes para el glaucoma entre diferentes especies, muchos de los medicamentos antiglaucomatosos que se utilizan con éxito en humanos y perros no son bien tolerados por los gatos y, por lo tanto, la elección farmacológica en esta especie es limitada. Un modelo experimental de glaucoma felino facilitaría el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas específicas. El objetivo de este trabajo fue desarrollar un modelo experimental de glaucoma en gatos.

Métodos. Cuatro gatos macho de pelo corto europeo esterilizados fueron sometidos a fotocoagulación de la malla trabecular mediante láser diodo (810 nm) en un ojo, mientras que el ojo contralateral fue sometido a un procedimiento simulado (control). El examen ocular consistió en la evaluación de la presión intraocular (PIO, Tonopen Vet), test de Schirmer, reflejo pupilar, tinción con fluoresceína, biomicroscopía (lámpara de hendidura), oftalmoscopia directa e indirecta y electroretinografía.

Resultados. El tratamiento con láser indujo un aumento significativo de la PIO al día 1, 3, 5, 7, 14 y 28 posquirúrgico. A los tres días se observó una leve hiperemia episcleral, midriasis y flare en los ojos tratados. A los 28 días luego de la cirugía no se encontraron signos de inflamación, la midriasis fue más pronunciada, se observó una disminución en el reflejo pupilar y excavación del nervio óptico. El electroretinograma de *flash* no difirió entre los grupos experimentales, en tanto que la amplitud de los potenciales visuales evocados fue menor en los ojos tratados con láser.

Conclusión. Estos resultados indican que la fotocoagulación de la malla trabecular reproduce características centrales del glaucoma felino.

Development of an experimental glaucoma model in cats

Objectives. Cat glaucoma is a therapeutic challenge in veterinary ophthalmology. Though there are several characteristics in common for glaucoma among different species, many of the antiglaucomatous drugs successfully used in humans and dogs are not well tolerated by cats, and, therefore, the therapeutic choice for this species is

limited. An experimental cat glaucoma model would facilitate the development of new specific therapeutic strategies. The aim of this paper was to develop an experimental glaucoma model in cats.

Methods. Four neutered male short-hair European cats underwent laser diode photocoagulation (810 nm) of the trabecular meshwork of one eye, while a simulated procedure was performed on the fellow eye (control). Ophthalmic examination involved intraocular pressure measurement (IOP, Tonopen Vet), Schirmer test, pupillary reflex evaluation, fluorescein staining, biomicroscopy (slit lamp), direct and indirect ophthalmoscopy and electroretinogram.

Results. Laser treatment induced a significant IOP rise on postoperative days 1, 3, 5, 7, 14 and 28. After three days there was mild episcleral hyperemia, mydriasis and flare in treated eyes. On day 28 postoperatively no signs of inflammation were found, mydriasis was more marked and there was decreased pupillary reflex and optic disc cupping. Flash electroretinograms did not differ between the experimental groups, while amplitude of visual evoked potentials was lower in laser-treated eyes.

Conclusion. These results are indicative of the fact that photocoagulation of the trabecular meshwork reproduces central features of glaucoma in cats.

Desenvolvimento de um modelo experimental de glaucoma felino

Objetivos. O glaucoma felino representa um desafio terapêutico em oftalmologia veterinária. Embora existam várias características comuns para o glaucoma entre diferentes espécies, muitos dos medicamentos antiglaucomatosos que se utilizam com sucesso em humanos e cachorros não são bem tolerados pelos gatos e, pelo tanto, a eleição farmacológica nesta espécie é limitada. Um modelo experimental de glaucoma felino facilitaria o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas específicas. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um modelo experimental de glaucoma em gatos.

Métodos. Quatro gatos macho de cabelo curto europeu esterilizados foram submetidos à foto-coagulação da malha trabecular mediante laser diodo (810 nm) em um olho, enquanto o olho contralateral foi submetido a um procedimento simulado (controle). O exame ocular consistiu na avaliação da pressão intraocular (PIO, Tonopen Vet), test de Schirmer, reflexo pupilar, tinção com fluoresceína, biomicroscopia (lâmpada de fenda), oftalmoscopia direta e indireta e eletrorretinografia.

Resultados. O tratamento com laser induziu um aumento significativo da PIO no dia 1, 3, 5, 7, 14 e 28 pós-cirúrgico. Aos três dias se observou uma leve hiperemia episcleral, midriase e flare nos olhos tratados. Aos 28 dias após a cirurgia não se encontraram sinais de inflamação, a midriase foi mais pronunciada, se observou uma diminuição no reflexo pupilar e escavação do nervo óptico. O eletrorretinograma de *flash* não foi diferente dos grupos experimentais, enquanto a amplitude dos potenciais visuais evocados foi menor nos olhos tratados com laser.

Conclusão. Estes resultados indicam que a foto-coagulação da malha trabecular reproduz características centrais do glaucoma felino.

Alteración de la funcionalidad y dinámica mitocondrial en células del epitelio pigmentario de la retina expuestas a luz LED azul y al fluoróforo A2E de la lipofuscina: implicancias en la degeneración macular asociada con la edad

Alaimo A^a, Bujjamer JM^b, García Liñares G^c, Gorojod RM^a, Porte Alcon S^a, Baldessari A^c, Grecco HE^b, Kotler ML^a

^aLaboratorio de Disfunción Celular en Enfermedades Neurodegenerativas y Nanomedicina, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires (IQUIBICEN-CONICET).

^bLaboratorio de Electrónica Cuántica, Departamento de Física, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires (IFIBA-CONICET).

^cLaboratorio de Biocatálisis, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires (UMYMFOR-CONICET).

Objetivo. La degeneración macular asociada con la edad (DMAE) involucra el deterioro progresivo del epitelio pigmentario de la retina (EPR). Es una enfermedad multifactorial y entre

los factores de riesgo se halla la exposición a la alta energía de la luz azul. La lipofuscina se acumula en las células del EPR y genera sensibilización frente al daño fotoquímico. Se estudió el efecto de la luz azul y el A2E (componente principal de la lipofuscina) sobre la funcionalidad y la integridad mitocondrial de células del EPR.

Métodos. Se expusieron células humanas ARPE-19 a una fuente de luz LED azul ($\lambda=445\text{nm}$; $1,7\text{mW/cm}^2$) durante 1-30 minutos seguido de un período en oscuridad (24 horas). Se estudiaron los siguientes parámetros: actividad metabólica mitocondrial (ensayo MTT), generación de ROS (sonda DCFDA) y superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$) (sonda MitoSOX) (espectrofluorometría y microscopía de fluorescencia). La integridad mitocondrial se analizó mediante inmunocitoquímica y microscopía de fluorescencia. A partir de las imágenes obtenidas y empleando el macro *mitochondrial morphology* del programa *ImageJ*, se cuantificaron los siguientes índices: elongación, interconectividad y masa mitocondrial. **Resultados.** La luz redujo significativamente la viabilidad de las células del EPR (1 min: $89 \pm 6\%$, 5 min: $81 \pm 2\%$, 15 min: $76 \pm 2\%$ 30 min: $52 \pm 5\%$), mientras que incrementó los niveles de ROS totales (1 min: $34 \pm 6\%$, 5 min: $37 \pm 2\%$, 15 min: $45 \pm 13\%$, 30 min: $53 \pm 4\%$). Se detectó producción de $\text{O}_2\cdot^-$ (74% , $p < 0,01$) a partir de un minuto de irradiación. La luz azul indujo disrupción de la red tubular reflejada por la aparición de mitocondrias fragmentadas, lo que correlaciona con la disminución de los índices de elongación e interconectividad (ejemplo: 30 min: 38% , $p < 0,001$ y 17% , $p < 0,05$, respectivamente) y masa mitocondrial (ejemplo: 30 min: 69% , $p < 0,05$). Por otro lado, las células con A2E incorporado ($1-100\mu\text{M}$) exhibieron una disminución dosis dependiente de la viabilidad celular (ej. $10\mu\text{M}$: $78 \pm 1\%$). Por otra parte, los parámetros de generación de $\text{O}_2\cdot^-$, la actividad metabólica y la morfología mitocondrial indicaron que la incorporación de A2E aumenta la susceptibilidad a la fototoxicidad. **Conclusiones.** Los déficits en la funcionalidad y dinámica mitocondrial en las células del EPR señalan la importancia de considerar a estas organelas como posibles blancos terapéuticos para la DMAE.

Impaired mitochondrial functionality and dynamics in pigment epithelium cells of retinas exposed to blue LED light and lipofuscin fluorophore A2E: implications in age-related macular degeneration

Objective. Age-related macular degeneration (ARMD) involves progressive impairment of retinal pigment epithelium (RPE) cells. It is a multifactorial disease, and among its risk factors, exposure to high energy of blue light is included. Lipofuscin accumulates in RPE cells and generates sensitization to photochemical damage. The effect of blue light and A2E (main component of lipofuscin) on RPE cell mitochondrial functionality and integrity was studied.

Methods. Human ARPE-19 cells were exposed to a blue LED light source ($\lambda=445\text{ nm}$; 1.7 mW/cm^2) for 1-30 minutes followed by a darkness period (24 hours) to study the following parameters: mitochondrial metabolic activity (MTT assay), ROS generation (DCFDA probe) and superoxide ($\text{O}_2^{\cdot-}$) (MitoSOX probe) (spectrofluorometry and fluorescence microscopy). Mitochondrial integrity was analyzed by immunocytochemistry and fluorescence microscopy. Mitochondrial morphology of the images thus obtained was analyzed using the ImageJ macro software to quantitate the following indices: elongation, interconnectivity and mitochondrial mass.

Results. Light reduced RPE cell viability (1 min: $89 \pm 6\%$, 5 min: $81 \pm 2\%$, 15 min: $76 \pm 2\%$, 30 min: $52 \pm 5\%$) significantly, while it increased total ROS levels (1 min: $34 \pm 6\%$, 5 min: $37 \pm 2\%$, 15 min: $45 \pm 13\%$, 30 min: $53 \pm 4\%$). $\text{O}_2^{\cdot-}$ production was detected (74%, $p < 0.01$) as from one minute of irradiation. Blue light induced tubular meshwork disruption as reflected by the emergence of fragmented mitochondria, which correlates with the decrease in mitochondrial elongation and interconnectivity (e.g.: 30 min: 38%, $p < 0.001$ and 17%, $p < 0.05$, respectively) and mitochondrial mass (e.g.: 30 min: 69%, $p < 0.05$). On the other hand, cells with incorporated A2E (1-100 μM) showed a dose-dependent decrease in cell viability (e.g.: 10 μM : $78 \pm 1\%$). Moreover, parameters of $\text{O}_2^{\cdot-}$ generation, metabolic activity and mitochondrial morphology

evidenced that A2E incorporation increased susceptibility to phototoxicity.

Conclusions. Deficits in mitochondrial functionality and dynamics in RPE cells show the importance of considering these organelles as possible therapeutic targets for ARMD.

Alteração da funcionalidade e dinâmica mitocondrial em células do epitélio pigmentar da retina expostas à luz LED azul e ao fluoróforo A2E da lipofuscina: implicações na degeneração macular associada com a idade

Objetivo. A degeneração macular associada com a idade (DMAE) envolve a deterioração progressiva do epitélio pigmentar da retina (EPR). É uma doença multifatorial e entre os fatores de risco está a exposição à alta energia da luz azul. A lipofuscina se acumula nas células do EPR e gera sensibilização ante o dano fotoquímico. Estudou-se o efeito da luz azul e o A2E (componente principal da lipofuscina) sobre a funcionalidade e a integridade mitocondrial de células do EPR.

Métodos. Expuseram-se células humanas ARPE-19 a uma fonte de luz LED azul ($\lambda=445\text{ nm}$; $1,7\text{ mW/cm}^2$) durante 1-30 minutos seguido de um período em obscuridade (24 horas). Estudaram-se os seguintes parâmetros: atividade metabólica mitocondrial (ensaio MTT), geração de ROS (sonda DCFDA) e superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) (sonda MitoSOX) (espectrofluorometria e microscopia de fluorescência). A integridade mitocondrial foi analisada mediante imunocitoquímica e microscopia de fluorescência. A partir das imagens obtidas e utilizando o macro *mitochondrial morphology* do programa *ImageJ*, quantificaram-se os seguintes índices: alongamento, interconectividade e massa mitocondrial.

Resultados. A luz reduziu significativamente a viabilidade das células do EPR (1 min: $89 \pm 6\%$, 5 min: $81 \pm 2\%$, 15 min: $76 \pm 2\%$, 30 min: $52 \pm 5\%$), enquanto incrementou os níveis de ROS totais (1 min: $34 \pm 6\%$, 5 min: $37 \pm 2\%$, 15 min: $45 \pm 13\%$, 30 min: $53 \pm 4\%$). Detectou-se produção de $\text{O}_2^{\cdot-}$ (74%, $p < 0,01$) a partir de um minuto de irradiação. A luz azul induziu disrupção da rede tubular refletida pela aparição de mitocôndrias

fragmentadas, o que correlaciona com a diminuição dos índices de alongação e interconectividade (exemplo: 30 min: 38%, $p < 0,001$ y 17%, $p < 0,05$, respectivamente) e massa mitocondrial (exemplo: 30 min: 69%, $p < 0,05$). De outro lado, as células com A2E incorporado (1-100 μ M) exibiram uma diminuição dose dependente da viabilidade celular (ej. 10 μ M: $78 \pm 1\%$). Além disso, os parâmetros de geração de $O_2\cdot^-$, a atividade metabólica e a morfologia mitocondrial indicaram que a incorporação de A2E aumenta a suscetibilidade à fototoxicidade.

Conclusões. Os déficits na funcionalidade e dinâmica mitocondrial nas células do EPR indicam a importância de considerar essas organelas como possíveis alvos terapêuticos para a DMAE.

Expresión y localización de galectina 1 durante el desarrollo de retinopatía inducida por oxígeno (OIR)

Ridano ME^a, Subirada PV^a, Paz MC^a, Lorenc VE^{ab}, Luna JD^c, Croci DO^d, Barcelona PF^a, Rabinovich GA^c, Sánchez MC^a

^aDepartamento de Bioquímica Clínica (CIBICI-CONICET), Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

^bDepartment of Ophthalmology, Johns Hopkins School of Medicine, Baltimore, Maryland, Estados Unidos.

^cFundación VER, Clínica Romagosa, Córdoba, Argentina.

^dLaboratorio de Inmunopatología (IBYME-CONICET), Buenos Aires. mridano@fcq.unc.edu.ar

Objetivos. La galectina 1 (Gal1) es una lectina que actúa en diversos procesos fisiopatológicos. Gal1 promueve la progresión tumoral a través de mecanismos que incluyen la evasión de la respuesta inmune y la estimulación angiogénica. Además, su expresión está regulada por hipoxia y su unión a glicanos en VEGFR2 se ha asociado a la regulación de la neovascularización (NV) en tumores refractarios a tratamientos con anti-VEGF. Considerando que las retinopatías neovasculares (RxNV) son las principales causas de ceguera irreversible y que muchos pacientes no responden adecuadamente al tratamiento con anti-VEGF, se propuso evaluar si Gal1 participa en la fisiopatología de RxNV.

Métodos. La retinopatía inducida por oxígeno (OIR): se expusieron ratones C57BL/6 a 75% O_2 desde el día posnatal 7 (P7) al P12 y se llevaron a aire durante 5 (P17 OIR) o 9 días (P26 OIR).

Como control se utilizaron animales de igual edad mantenidos en aire (RA). Algunos ratones P12 OIR se sometieron a inyecciones intravítreas con anti-VEGF o PBS. La expresión retinal de VEGF y Gal1 se analizó por *Western blot* y qRT-PCR y la localización de Gal1, mediante inmunofluorescencia que utilizaba anticuerpos contra marcadores celulares específicos como GFAP y CD31. Además, el perfil de glicosilación de las retinas se analizó mediante comarcaciones con las lectinas biotiniladas LEL, L-PHA y SNA.

Resultados. Los niveles proteicos y de ARNm de Gal1 se encontraron aumentados en P17 y P26 OIR respecto de RA, incluso en las retinas de ratones inyectados con anti-VEGF. Tanto en RA como en OIR Gal1 se localizó en las capas retinales más cercanas al vítreo (NFL, GCL and IPL). Gal1 colocalizó con GFAP en P17 y P26 RA y OIR y se observó en el interior de células CD31 positivas solo en NV durante OIR. Además hubo una alta colocalización de Gal1 con LEL en P17 tanto en RA como OIR y sólo en OIR con L-PHA. La marcación de SNA disminuyó en retinas OIR y no se observó colocación con Gal1.

Conclusiones. Los resultados sugieren que Gal1 participa en la NV retinal durante OIR. El perfil de glicosilación en OIR fue favorable para la unión de Gal1, lo cual podría indicar su acción mediante unión a glicanos de VEGFR2. Además, la acción de Gal1 sería independiente del tratamiento con Anti-VEGF.

Galectin 1 expression and localization during development of oxygen-induced retinopathy (OIR)

Objectives. Galectin 1 (Gal1) is a lectin that exerts its action on many pathophysiological processes. Gal1 promotes tumor progression via mechanisms including evasion of immune response and angiogenic stimulation. Furthermore, its expression is regulated by hypoxia, and its binding to glycans in VEGFR2 has been associated with the regulation of neovascularization (NV) in tumors refractory to anti-VEGF therapy. Given the fact that neovascular retinopathies (NVRx) are the main cause

of irreversible blindness, and that many patients are poorly responsive to anti-VEGF therapy, our goal was to evaluate whether Gal1 is involved in the pathophysiology of NVRx.

Methods. Oxygen-induced retinopathy: C57BL/6 mice were exposed to 75% O₂ from postnatal day 7 (P7) to P12 and they were placed in room air (RA) for 5 (P17 OIR) or 9 days (P26 OIR). Animals of the same age maintained in RA were used as controls. Some mice received intravitreal injections of anti-VEGF or PBS at P12 OIR. Retinal VEGF and Gal1 expression was analyzed by Western blotting and qRT-PCR, and Gal1 localization was determined by immunofluorescence using antibodies against specific cell markers such as GFAP and CD31. In addition, glycosylation profile of the retinas was analyzed by co-labeling with biotinylated lectins LEL, PHA-L and SNA.

Results. Protein and mRNA levels of Gal1 were increased at P17 and P26 OIR vs. RA, even in retinas of mice injected with anti-VEGF. Both in RA and in OIR, Gal1 was localized in the retinal layers closer to the vitreous (NFL, GCL and IPL). There was co-localization of Gal1 with GFAP at P17 and P26 in RA and OIR, and it was observed inside CD31-positive cells only during OIR. In addition, there was high co-localization of Gal1 with LEL at P17 both in RA and OIR and only in OIR with PHA-L. SNA labeling decreased in OIR retinas, with co-localization with Gal1 observed.

Conclusions. Results obtained suggest that Gal1 is involved in retinal NV during OIR. The glycosylation profile during OIR was favorable to Gal1 binding, and this might indicate that it exerts its action via binding to glycans on VEGFR2. Moreover, Gal1's mode of action is thought to be independent of anti-VEGF therapy.

Expressão e localização de galectina 1 durante o desenvolvimento de retinopatia induzida por oxigênio (OIR)

Objetivos. A galectina 1 (Gal1) é uma lectina que age em diversos processos fisiopatológicos. Gal1 promove a progressão tumoral através de

mecanismos que incluem a evasão da resposta imune e a estimulação antigênica. Além disso, sua expressão está regulada por hipóxia e sua união a glicanos em VEGFR2 tem se associado à regulação da neovascularização (NV) em tumores refratários a tratamentos com anti-VEGF. Considerando que as retinopatias neovasculares (RxNV) são as principais causas de cegueira irreversível e que muitos pacientes não respondem adequadamente ao tratamento com anti-VEGF, foi proposto avaliar se Gal1 participa na fisiopatologia de RxNV.

Métodos. A retinopatia induzida por oxigênio (OIR): foram expostos ratos C57BL/6 a 75% O₂ a partir do dia pós-natal 7 (P7) a P12 e foram levados ao ar durante 5 (P17 OIR) ou 9 dias (P26 OIR). Como controle se utilizaram animais de igual idade mantidos em ar (RA). Alguns ratos P12 OIR se submeteram a injeções intravitreas com anti-VEGF ou PBS. A expressão retiniana de VEGF e Gal1 se analisou por *Western blot* e qRT-PCR e a localização de Gal1, mediante imunofluorescência que utilizava anticorpos contra marcadores celulares específicos como GFAP e CD31. Além disso, o perfil de glicosilação das retinas foi analisado mediante comarcações com as lectinas biotiniladas LEL, L- PHA e SNA.

Resultados. Os níveis proteicos e de ARNm de Gal1 estavam aumentados em P17 e P26 OIR respeito de RA, até nas retinas de ratos injetados com anti-VEGF. Tanto em RA quanto em OIR Gal1 se localizou nas camadas retiniais mais próximas ao vítreo (NFL, GCL and IPL). Gal1 colocalizou com GFAP em P17 y P26 RA e OIR e se observou no interior de células CD31 positivas apenas em NV durante OIR. Além disso, houve uma alta colocalização de Gal1 com LEL em P17 tanto em RA quanto OIR e apenas em OIR com L-PHA. A marcação de SNA diminuiu em retinas OIR e não se observou colocalização com Gal1.

Conclusões. Os resultados sugerem que Gal1 participa na NV retiniana durante OIR. O perfil de glicosilação em OIR foi favorável para a união de Gal1, o qual poderia indicar sua ação mediante união a glicanos de VEGFR2. Além disso, a ação de Gal1 seria independente do tratamento com Anti-VEGF.

Efectos de la exposición constante de neuronas retinales a luces LED en diferentes poblaciones

Benedetto MM^a, Quinteros-Quintana ML^b, Maldonado AC^b, Guido ME^a, Contin MA^a

^a CIQUIBIC-CONICET, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

^b Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
mbenedetto@fcq.unc.edu.ar

Introducción. La retina es un circuito neuronal complejo responsable de transducir la luz en un patrón de impulsos eléctricos que informan al cerebro acerca del mundo visible. En vertebrados, se conoce que este tejido está formado por tres clases de células fotorreceptoras, conos y bastones responsables de la visión, y las células ganglionares intrínsecamente fotosensibles (CGRif), involucradas en diversas funciones no visuales, como por ejemplo el reflejo pupilar y la regulación de los ritmos circadianos.

Objetivo. Debido a que pocos trabajos evalúan el efecto de la exposición a luz LED de baja intensidad sobre la retina es que nos propusimos estudiar sus efectos sobre los fotorreceptores visuales y las CGRif, en especial sobre sus opsinas: rodopsina, melanopsina (Opn4) y neuropsina (Opn5). Además, con el objetivo de continuar estudiando los mecanismos que producen la muerte de estas células, se evaluó el contenido de especies reactivas derivadas del oxígeno (ROS).

Métodos. Para ello, al trabajar con ratas macho albinas *Wistar*, utilizamos un protocolo de degeneración retinal (DR) basado en la exposición constante de estos animales a luz LED blanca fría de 200 lux de intensidad de 1 a 8 días (LL1-LL8). Como controles se utilizaron animales expuestos por 7 días a ciclos de luz: oscuridad (12 horas: 12 horas) y animales expuestos durante 4 días a oscuridad constante.

Resultados. Al evaluar los efectos de la exposición constante a luz LED sobre el número de CGR, incluyendo las CGRif, se encontró que no se altera en animales expuestos a luz. Sin embargo, el análisis de la expresión de Opn4 evidenció un aumento en su expresión en animales expuestos a luz (LL8); además se observó

un cambio en su localización ya que ella desaparece de los procesos y se localiza exclusivamente en el soma de estas células. El análisis de Opn5 reveló que tiene una localización exclusivamente nuclear en CGR y capa nuclear interna, lo cual es más visible a medida que aumentan los días de exposición a luz. El estudio de rodopsina reveló que su expresión no se altera como consecuencia de la exposición a luz; sin embargo está más fosforilada. Esta fosforilación es reversible luego de mantener los animales en oscuridad por 48 horas. El análisis del fenómeno de estrés oxidativo mostró un aumento significativo de ROS a partir del quinto día de exposición a luz mientras que la actividad enzimática de catalasa no resultó diferente entre los grupos experimentales.

Conclusión. En conjunto, todos estos resultados sugieren que existe un mecanismo de DR con una reestructuración de células fotorreceptoras como consecuencia de la exposición a luces LED de baja intensidad.

Effects of constant retinal neuron exposure to LED lighting in different populations

Introduction. The retina is a complex neuronal circuit responsible for transducing light in an electrical impulse pattern that informs the brain about the visible world. In vertebrates, this tissue is known to be formed by three photoreceptor cell classes, rods and cones, which are responsible for vision, and intrinsically-photosensitive ganglion cells (ipRGC), which are involved in many non-visual functions, such as the pupillary reflex and circadian rhythm regulation.

Objective. Since there are very few papers in the literature evaluating the effect of low-intensity LED light exposure on the retina, we decided to study its effects on visual photoreceptors and ipRGCs, particularly on their opsins: rhodopsin, melanopsin (Opn4) and neuropsin (ON5). Furthermore, with the aim of further investigating the mechanisms producing death of these cells, the content of reactive oxygen-derived species (ROS) was evaluated.

Methods. We worked on male Wistar albino rats according to a retinal degeneration (RD) protocol based on constant exposure of these animals to a 200 lux intensity of cold-white LED light between 1 and 8 days (LL1-LL8). Animals exposed for 7 days to light: dark cycles (12 hours : 12 hours) and animals exposed for 4 days to constant darkness were used as controls.

Results. Evaluation of the effects of constant LED light exposure on number of RGCs, including ipRGC, revealed no change in them. However, Opn4 expression had an increase in animals exposed to light (LL8); in addition, there was a change in its localization, since it disappeared from the RGC processes and it was only localized on their soma. Opn5 analysis evidenced an exclusively nuclear localization in RGC and inner nuclear layer, which is more visible as days of light exposure increase. Analysis of rhodopsin revealed that its expression does not suffer any changes as a consequence of light exposure; however it is more phosphorylated. This phosphorylation is reversible after 48 hours of exposure to darkness. Analysis of this oxidative stress phenomenon failed to evidence any significant ROS increase as from day 5 of light exposure, while catalase enzymatic activity did not show differences between the experimental groups.

Conclusion. All these results together suggest that there is a RD mechanism with photoreceptor cell restructuring as a consequence of low-intensity LED lighting.

Efeitos da exposição constante de neurônios retiniais a luzes LED em diferentes populações

Introdução. A retina é um circuito neuronal complexo responsável de transduzir a luz em um padrão de impulsos elétricos que informam ao cérebro acerca do mundo visível. Em vertebrados, se conhece que este tecido está formado por três classes de células fotorreceptoras, cones e bastões responsáveis da visão, e as células ganglionares intrinsecamente fotossensíveis (CGRif), envolvidas em diversas funções não visuais, como por exemplo o reflexo pupilar e a regulação dos ritmos circadianos.

Objetivo. Devido a que poucos trabalhos avaliam o efeito da exposição a luz LED de baixa intensidade sobre a retina é que nos propusemos estudar seus efeitos sobre os fotorreceptores visuais e as CGRif, em especial sobre suas opsinas: rodopsina, melanopsina (Opn4) e neuropsina (Opn5). Além disso, com o objetivo de continuar estudando os mecanismos que produzem a morte destas células, foi avaliado o conteúdo de espécies reativas derivadas do oxigênio (ROS).

Métodos. Para isso, ao trabalhar com ratos macho albinos *Wistar*, utilizamos um protocolo de degeneração retiniana (DR) baseado na exposição constante destes animais a luz LED branca fria de 200 lux de intensidade de 1 a 8 dias (LL1-LL8). Como controles se utilizaram animais expostos por 7 dias a ciclos de luz: obscuridade (12 horas: 12 horas) e animais expostos durante 4 dias a obscuridade constante.

Resultados. Ao avaliar os efeitos da exposição constante a luz LED sobre o número de CGR, incluindo as CGRif, se encontrou que não se altera em animais expostos à luz. Porém, a análise da expressão de Opn4 evidenciou um aumento em sua expressão em animais expostos a luz (LL8); além disso, se observou uma mudança na sua localização já que ela desaparece dos processos e se localiza exclusivamente na soma destas células. A análise de Opn5 revelou que tem uma localização exclusivamente nuclear em CGR e camada nuclear interna, o que é mais visível à medida que aumentam os dias de exposição a luz. O estudo de rodopsina revelou que sua expressão não se altera como consequência da exposição à luz; porém, está mais fosforilada. Esta fosforilação é reversível após manter os animais em obscuridade por 48 horas. A análise do fenômeno de stress oxidativo mostrou um aumento significativo de ROS a partir do quinto dia de exposição à luz enquanto a atividade enzimática de catalase não resultou diferente entre os grupos experimentais.

Conclusão. Em conjunto, todos estes resultados sugerem que existe um mecanismo de DR com uma reestruturação de células fotorreceptoras como consequência da exposição a luzes LED de baixa intensidade.

Autofagia en el modelo murino de retinopatía inducida por oxígeno: ¿igual efecto para todas las células?

Subirada PV, Barcelona PF, Paz MC, Ridano ME, Bonacci GR, Chiabrando GA, Sánchez MC

Departamento de Bioquímica Clínica (CIBICI-CONICET), Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

Objetivo. Múltiples drogas que modulan la vía autofágica se postularon como potenciales inhibidores de la neovascularización, tanto en patologías oculares como en cáncer. Dada la complejidad de factores involucrados en las retinopatías y las distintas alteraciones que cada tipo celular sufre, es esencial que los tratamientos apunten a terapias integradas que contemplen los requerimientos de cada célula. La idea es determinar si el bloqueo de la vía autofágica genera efectos idénticos a nivel neuronal y vascular, a fin de comprender mejor la participación de dicho mecanismo en la patología.

Métodos. Ratones C57/BL6 se expusieron a 75% de oxígeno desde el día posnatal (P)7 y devueltos a oxígeno ambiental en P12. Ratones de la misma edad mantenidos en oxígeno ambiental se usaron como controles. Un grupo de roedores fue inyectado intraocularmente con 3-metiladenina (un inhibidor de la autofagia) o solución salina, en cada ojo a P12 y otro grupo a P17. Los animales se sacrificaron en P17 y P26.

Resultados: Retinas completas se tiñeron con lectina GSA IB4 y se montaron en *flat mount* para analizar la presencia de neovasos y área avascular. Los datos cuantitativos demuestran que la inyección en P12 disminuye el área ocupada por neovasos en la retina, aunque no favorece la revascularización completa. Adicionalmente, se observó que la inyección en P12 disminuyó el diámetro vascular de los vasos de mayor calibre y la distancia entre el nervio óptico y la primera ramificación. *Western blot* de extractos de retinas totales y tinción de criocortes por inmunofluorescencia evidenciaron que no hay cambios en el sistema α 2-macroglobulina/LRP-1. Por otro lado, los cambios funcionales y tinción de TUNEL evidenciaron que la inyección de 3-MA produjo neurodegeneración.

Conclusión. El proceso autofágico cumpliría un rol esencial para la sobrevivencia neuronal, mien-

tras que a nivel vascular la modificación del flujo autofágico impediría el desarrollo de neovasos.

Autophagy in a murine model of oxygen-induced retinopathy: the same effect for all cells?

Objective. Multiple drugs modulating the autophagic pathway have been postulated as potential neovascularization inhibitors, both in ocular diseases and in cancer. Given the complexity of the factors involved in retinopathies and the different changes suffered by each type of cell, it is essential for treatments to involve comprehensive therapies meeting each cell's requirements. The goal is to determine whether autophagic pathway blockade generates identical effects at the neuronal and vascular levels in order to better understand the involvement of this mechanism in this disease.

Methods. C57/BL6 mice were exposed to 75% oxygen as from postnatal (P) day 7 and returned to environmental oxygen at P12. Mice of the same age maintained under environmental oxygen conditions were used as controls. A group of rodents received intraocular injections of 3-methyl adenine (an autophagy inhibitor) or saline solution in each eye at P12 while another group underwent the same treatment at P17. Animals were sacrificed at P17 and P26.

Results: Whole retinas were stained with GSA IB4 lectin and flat-mounted to analyze the presence of neovessels and of an avascular area. Quantitative data demonstrate that the injection given at P12 reduced the area occupied by neovessels in the retina, though it did not favor complete revascularization. In addition, it was observed that the injection at P12 reduced the vascular diameter of greater-caliber vessels and the distance between the optic nerve and the first ramification. Western blotting of whole-retina extracts and cryosection staining by immunofluorescence evidenced no changes in the α 2-macroglobulin/LRP-1 system. On the other hand, functional changes and TUNEL staining demonstrated that the 3-MA injection produced neurodegeneration.

Conclusion. The autophagic process is thought to have an essential role in neuronal survival,

while at the vascular level the autophagic flow modification might prevent the development of neovessels.

Autofagia no modelo murino de retinopatia induzida por oxigênio: igual efeito para todas as células?

Objetivo. Múltiplas drogas que modulam a via autofágica se postularam como potenciais inibidores da neovascularização, tanto em patologias oculares quanto em câncer. Dada a complexidade de fatores envolvidos nas retinopatias e as distintas alterações que cada tipo celular sofre, é essencial que os tratamentos apontem a terapias integradas que contemplem os requerimentos de cada célula. A ideia é determinar se o bloqueio da via autofágica gera efeitos idênticos em nível neuronal e vascular, com o fim de compreender melhor a participação desse mecanismo na patologia.

Métodos. Ratos C57/BL6 se expuseram a 75% de oxigênio a partir do dia pós-natal (P)7 e devolutos a oxigênio ambiental em P12. Ratos da mesma idade mantidos em oxigênio ambiental se usaram como controles. Um grupo de roedores foi injetado intraocularmente com 3-metiladenina (um inibidor da autofagia) ou solução salina, em cada olho a P12 e outro grupo a P17. Os animais se sacrificaram em P17 e P26.

Resultados: Retinas completas se tingiram com lectina GSA IB4 e se montaram em *flat mount* para analisar a presença de neovasos e área avascular. Os dados quantitativos demonstram que a injeção em P12 diminuiu a área ocupada por neovasos na retina, embora não favorece a revascularização completa. Adicionalmente, se observou que a injeção em P12 diminuiu o diâmetro vascular dos vasos de maior calibre e a distância entre o nervo óptico e a primeira ramificação. *Western blot* de extratos de retinas totais e tinção de criocortes por imunofluorescência evidenciaram que não há alterações no sistema α 2-macroglobulina/LRP-1. De outro lado, as alterações funcionais e tinção de TUNEL evidenciaram que a injeção de 3-MA produziu neurodegeneração.

Conclusão. O processo autofágico cumpriria um papel essencial para a sobrevivência neuronal,

enquanto em nível vascular a modificação do fluxo autofágico impediria o desenvolvimento de neovasos.

Nueva vía de administración de un péptido antagonista de p75NTR en un modelo de retinopatía diabética

Barcelona PF^{ab}, Galan A^a, Nedev H^a, Saragovi HU^a

^a Lady Davis Institute-Jewish General Hospital; Center for Translational Research, Department of Pharmacology and Therapeutics, McGill University, Montreal, Quebec, Canada.

^b CIBICI-CONICET, Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. pbarcelona@fcq.unc.edu.ar

Objetivo. La administración de fármacos oculares siempre ha sido un desafío importante para los farmacólogos y los oftalmólogos especialistas en retina debido a la disposición anatómica especial y fisiología ocular. La administración intravítrea (IVT) de fármacos representa una de las vías más tradicionales de administración. Sin embargo, los rendimientos muchas veces son sub óptimos y causan efectos secundarios severos. El objetivo de este trabajo fue investigar una ruta alternativa para el suministro de fármacos oculares en un modelo de retinopatía diabética (RD). Para ello, utilizamos inyecciones subconjuntivales (SCJ) de un antagonista del receptor de neurotrofinas (p75NTR), un péptido mimético llamado THX-B, cuya eficacia en la diabetes ha sido previamente demostrada por administración de inyecciones IVT.

Métodos. Se examinó la estabilidad de THX-B en plasma, como así también sus propiedades farmacocinéticas luego de la administración IVT o SCJ. En ambos casos se realizó una extracción orgánica del compuesto para su posterior análisis por *high performance liquid chromatography* (HPLC). El potencial efecto terapéutico de THX-B (SCJ) se estudió en un modelo de ratones diabéticos tipo 1 que presentan retinopatía. Criterios de valoración: cuantificación de la estructura de la retina por OCT, expresión de p75NTR y proNGF, como así también de factores neurotóxicos tales como TNF α y α 2M por WB e IF y permeabilidad vascular a través de la extravasación de azul de Evans.

Resultados. Se observó una buena estabilidad de THX-B en plasma como así también se comprobó que la administración SCJ de THX-B protege la estructura retinal, reduce la producción de factores neurotóxicos y previene el edema en la RD. Estos resultados soportan a la vía SCJ como una alternativa de administración de fármacos oculares, demostrando una eficacia similar a la IVT y revalida a p75 como blanco para el tratamiento de la RD.

Conclusión. La vía SCJ ofrece una alternativa más ventajosa, menos invasiva y más compatible para la administración de fármacos en el tratamiento de enfermedades retinales.

A new route of administration of a p75NTR antagonist peptide in a diabetic retinopathy model

Objective. Administration of ocular drugs has always been a significant challenge for pharmacologists and ophthalmologists specialized in retina due to the special anatomic arrangement and ocular physiology. Intravitreal (IVT) drug injection is one of the most traditional routes of administration. However, performance is usually suboptimal and they cause severe side events. The aim of this paper was to investigate an alternative route for administration of ocular drugs in a diabetic retinopathy (DR) model. For this purpose we used subconjunctival (SCJ) injections of a neurotrophin receptor antagonist (p75NTR), a mimetic peptide known as THX-B, whose efficacy in diabetes in IVT injections has already been established.

Methods. Stability of THX-B in plasma, as well as its pharmacokinetic properties after IVT or SCJ administration was evaluated. Organic extraction of the compound for its subsequent analysis by high performance liquid chromatography (HPLC) was carried out in both cases. The potential therapeutic effect of THX-B (SCJ) was studied in a type 1 diabetes model in mice with retinopathy. Assessment criteria were the following: retinal structure quantification by OCT, p75NTR and proNGF expression as well as other neurotoxic factors such as TNF α and α 2M by WB and IF, and vascular permeability by Evans blue extravasation.

Results. There was good THX-B stability in plasma and SCJ THX-B administration was evidenced to protect the retinal structure, to reduce neurotoxin factor production and to prevent edema in DR. These results support the SCJ route as an alternative for ocular drug administration, with a similar efficacy than the IVT route, and revalidates p75 as a therapeutic target for DR therapy.

Conclusion. The SCJ route of administration offers a more advantageous, less invasive and more compatible alternative for drug administration in the treatment of retinal diseases.

Nova via de administração de um peptídeo antagonista de p75NTR em um modelo de retinopatia diabética

Objetivo. A administração de fármacos oculares sempre tem sido um desafio importante para os farmacólogos e os oftalmologistas especialistas em retina devido à disposição anatômica especial e fisiologia ocular. A administração intravítrea (IVT) de fármacos representa uma das vias mais tradicionais de administração. No entanto, os rendimentos muitas vezes são sub ótimos e causam efeitos secundários severos. O objetivo deste trabalho foi pesquisar uma rota alternativa para o fornecimento de fármacos oculares em um modelo de retinopatia diabética (RD). Para isso, utilizamos injeções subconjuntivais (SCJ) de um antagonista do receptor de neurotrofinas (p75NTR), um peptídeo mimético chamado THX-B, cuja eficácia na diabetes tem sido previamente demonstrada por administração de injeções IVT.

Métodos. Examinou-se a estabilidade de THX-B em plasma, e suas propriedades farmacocinéticas após a administração IVT ou SCJ. Em ambos os casos se realizou uma extração orgânica do composto para sua posterior análise por *high performance liquid chromatography* (HPLC). O potencial efeito terapêutico de THX-B (SCJ) se estudou em um modelo de ratos diabéticos tipo 1 que apresentam retinopatia. Critérios de valoração: quantificação da estrutura da retina por OCT, expressão de p75NTR e proNGF, e de fatores neurotóxicos tais como TNF α e α 2M por

WB, e IF e permeabilidade vascular através da extravasação de azul de Evans.

Resultados. Observou-se uma boa estabilidade de THX-B em plasma assim como também se comprovou que a administração SCJ de THX-B protege a estrutura retiniana, reduz a produção de fatores neurotóxicos e evitam o edema na RD. Estes resultados suportam a via SCJ como uma alternativa de administração de fármacos oculares, demonstrando uma eficácia similar à IVT e revalida a p75 como alvo para o tratamento da RD.

Conclusão. A via SCJ oferece uma alternativa mais vantajosa, menos invasiva e mais compatível para a administração de fármacos no tratamento de doenças retiniais.

IGF-1R regula la neovascularización patológica y la funcionalidad retinal en un modelo de ratón de retinopatía inducida por oxígeno (OIR)

Paz MC^a, Lorenc VE^{ac}, Subirada Caldarone PV^a, Ferrer DG^a, Luna JD^b, Chiabrando GA^a, Sánchez MC^a

^a Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI-CONICET), Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

^b Centro Privado de Ojos Romagosa-Fundación VER, Córdoba, Argentina.

^c The Wilmer Eye Institute, Johns Hopkins University, Baltimore, Maryland, Estados Unidos.

Introducción. En enfermedades isquémicas proliferativas como la retinopatía del prematuro, la hipoxia persistente produce la liberación de factores que participan en la formación de vasos anormales, causando ceguera. La activación de metaloproteinasas (MMP-2 y MMP-9) representa una vía final común en este proceso. Uno de los factores más estudiados es VEGF; sin embargo, el rol del factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) y su receptor (IGF-1R) no ha sido completamente determinado. Evidencias *in vitro* de nuestro laboratorio indican que IGF-1R, bajo estímulo con IGF-1, regula la actividad de MMP en células de Müller, sugiriendo que este sistema participa en el proceso de neovascularización (NV) retinal.

Objetivo. Evaluar *in vivo* la participación del sistema IGF-1/IGF-1R analizando aspectos vasculares y funcionales retinales en un modelo

de OIR en ratones, el cual ha sido ampliamente estandarizado y reproducido en nuestro laboratorio.

Métodos. Ratones C57BL6 de 7 días posnatal (P7) se expusieron a hiperoxia (75% de O₂) y luego a hipoxia relativa (21% de O₂), mientras otro grupo de ratones de la misma edad se mantuvieron en oxígeno ambiental. Se analizó la expresión de MMP por *Western blot*, así como la actividad de MMP-2 por ensayo de zimografía, en extractos retinales obtenidos en cada etapa del modelo OIR. Además, un grupo de ratones OIR, a P12, recibieron por vía intraocular un anticuerpo (αIR3) que bloquea específicamente la activación de IGF-1R. A P17 se evaluó en estos animales la funcionalidad retinal por electroretinografía (ERG) y luego se sacrificaron. Finalmente, en las retinas completas extraídas se analizó por microscopía confocal el área neovascular y avascular, utilizando la isolectina GSA-IB4.

Resultados. Extractos retinales de ratones OIR mostraron un aumento en la expresión de MMP-2 activa y MT1-MMP a P17, lo cual coincide con la fase activa del proceso de neovascularización. En igual sentido, por ensayos de zimografía observamos un incremento en la actividad de MMP-2. Finalmente, el bloqueo del IGF-1R logró prevenir la NV patológica, acelerar la revascularización fisiológica y mejorar la funcionalidad retinal en el día P17.

Conclusión. Estos resultados sugieren que el bloqueo terapéutico con αIR3 en el modelo OIR podría constituir una posible alternativa en el tratamiento de las retinopatías al prevenir la NV y neurodegeneración inducida por los elevados niveles de IGF-1 en la retina.

IGF-1R regulates pathologic neovascularization and retinal functionality in a mouse model of oxygen-induced retinopathy (OIR)

Introduction. In proliferative ischemic diseases such as retinopathy of prematurity, persistent hypoxia produces the release of factors involved in abnormal vessel formation, with the consequence of blindness. Metalloproteinase (MMP-2

and MMP-9) activation is a common final pathway in this process. One of the most extensively studied factors is VEG; however, the role of the type 1 insulin growth factor-1 (IGF-1) and its receptor (IGF-1R) has still not been fully elucidated. In vitro evidences in our laboratory indicate that IGF-1R, stimulated by IGF-1, regulates MMP activity in Müller cells, thus suggesting that this system is involved in the retinal neovascularization (NV) process.

Objective. To evaluate IGF-1/IGF-1R system involvement in vivo, by analyzing retinal vascular and functional aspects in an OIR model using mice that has been extensively standardized and reproduced in our laboratory.

Methods. C57BL6 mice were exposed to hyperoxia (75% O₂) followed by relative hypoxia (21% O₂) at postnatal day 7 (P7), while another group of mice of the same age was maintained under environmental oxygen conditions. MMP expression was analyzed by Western blotting, and MMP-2 activity, by zymography assays, in retinal extracts obtained from each OIR model stage. In addition, a group of OIR mice, at P12, received an intraocular antibody (α IR) that specifically blocks IGF-1R activation. Retinal functionality was evaluated by electroretinography (ERG) in these animals at P17 and then they were sacrificed. Finally, confocal microscopy was used to analyze the neovascular and avascular areas in whole-retina extracts, using GSA-IB4 isolectin.

Results. Retinal extracts from OIR mice evidenced an increase in the expression of active MMP-2 and MT1-MMP at P17, coincident with the active phase in the neovascularization process. Likewise, zymography assays revealed an increase in MMP-2 activity. Finally, IGF-1R blockade was able to prevent pathologic NV, to accelerate physiologic revascularization and to improve retinal functionality at P17.

Conclusion. These results suggest that therapeutic α IR3 blockade in the OIR model might offer a possible alternative for the treatment of retinopathies by preventing the NV and neurodegeneration induced by IGF-1 elevated levels in the retina.

IGF-1R regula a neovascularização patológica e a funcionalidade retiniana em um modelo de rato de retinopatia induzida por oxigênio (OIR)

Introdução. Em doenças isquêmicas proliferativas como a retinopatia do prematuro, a hipóxia persistente produz a liberação de fatores que participam na formação de vasos anormais, causando cegueira. A ativação de metaloproteinases (MMP-2 y MMP-9) representa uma via final comum neste processo. Um dos fatores mais estudados é VEG; porém, o papel do fator de crescimento insulínico tipo 1 (IGF-1) e seu receptor (IGF-1R) não tem sido completamente determinado. Evidências *in vitro* de nosso laboratório indicam que IGF-1R, sob estímulo com IGF-1, regula a atividade de MMP em células de Müller, sugerindo que este sistema participa no processo de neovascularização (NV) retiniana.

Objetivo. Avaliar *in vivo* a participação do sistema IGF-1/IGF-1R analisando aspectos vasculares e funcionais retiniais em um modelo de OIR em ratos, o qual tem sido amplamente estandarizado e reproduzido em nosso laboratório.

Métodos. Ratos C57BL6 de 7 dias pós-natal (P7) se expuseram a hiperoxia (75% de O₂) e após a hipóxia relativa (21% de O₂), enquanto outro grupo de ratos da mesma idade se mantiveram em oxigênio ambiental. Analisou-se a expressão de MMP por *Western blot*, bem como a atividade de MMP-2 por ensaio de zimografia, em extratos retiniais obtidos em cada etapa do modelo OIR. Além disso, um grupo de ratos OIR, a P12, receberam por via intraocular um anticorpo (α IR3) que bloqueia especificamente a ativação de IGF-1R. A P17 se avaliou em estes animais a funcionalidade retiniana por eletroretinografia (ERG) e depois foram sacrificados. Finalmente, nas retinas completas extraídas se analisou por microscopia confocal a área neovascular e avascular, utilizando a isolectina GSA-IB4.

Resultados. Extratos retiniais de ratos OIR mostraram um aumento na expressão de MMP-2 ativa e MT1-MMP a P17, o qual coincide com a fase ativa do processo de neovascularização. No mesmo sentido, por ensaios de zimografia observamos um incremento na atividade de MMP-2.

Finalmente, o bloqueio do IGF-1R conseguiu prevenir a NV patológica, acelerar a revascularização fisiológica e melhorar a funcionalidade retiniana no dia P17.

Conclusão. Estes resultados sugerem que o bloqueio terapêutico com aIR3 no modelo OIR poderia constituir uma possível alternativa no tratamento das retinopatias ao prevenir a NV e neurodegeneração induzida pelos elevados níveis de IGF-1 na retina.

Hemorragia en altura

Borrone MA^a, Torres RM^b

^a Clínica Privada de Ojos Dr. Enrique Alza, La Plata, Argentina, y Diagnóstico Ocular, Buenos Aires.

^b Centro de Ojos Dr. Lódolo, Paraná, Entre Ríos, Argentina. agustinaborrone@hotmail.com.ar

Objetivo. Los cambios bruscos de presión atmosférica podrán generar cambios vasculares en la retina. A continuación se propone presentar un caso clínico y revisar su potencial fisiopatología.

Métodos. Presentación del caso con búsqueda bibliográfica y actualización del tema.

Resultados. Paciente masculino de 36 años de edad concurre a la consulta con disminución brusca de la visión en el ojo derecho asociada a pérdida del conocimiento durante el ascenso a una montaña. Al examen oftalmológico se constata hemorragia macular asociada con hemorragias difusas en el ojo derecho y en el izquierdo, hemorragias en llama en las arcadas vasculares. Luego de un año el paciente regresa a la consulta y se constata resolución espontánea *ad integrum* de las hemorragias en ambos ojos.

Conclusión. La enfermedad aguda de la montaña se manifiesta en personas no aclimatadas. Los cambios en la presión atmosférica generarían reducción de la presión parcial de oxígeno sanguíneo, con lo cual se generarían a nivel ocular una serie de cambios vasculares en la retina. Estos cambios se reducen en frecuencia si hay un periodo de adaptación durante el ascenso. La presencia de retinopatía de la altura alerta además sobre la posibilidad de desarrollar enfermedad cerebral relacionada con la altura.

High-altitude retinal hemorrhage

Objective. Sudden atmospheric pressure changes may generate retinal vascular alterations. The purpose of this report is to present a clinical case and to review its potential pathophysiology.

Methods. Case report with literature search and update on the topic.

Results. 36-year-old male patient presenting with a sudden decrease in the vision of the right eye associated with loss of consciousness during ascent of a mountain. Ophthalmologic examination reveals the presence of macular hemorrhage associated with diffuse bleeding in both eyes and flame-shaped hemorrhages in the vascular arcades. After one year, when the patient came back for consultation, there was spontaneous *resitutio ad integrum* of the hemorrhages found in both eyes.

Conclusion. Acute mountain sickness manifests itself in non-acclimatized individuals. Atmospheric pressure changes generate a reduction in blood oxygen partial pressure, thereby generating a series of retinal vascular changes at the ocular level. These changes occur less frequently if there is an adaptation period before ascent. The presence of high-altitude retinopathy is also a warning signal of the likelihood of developing high-altitude-related brain disorders.

Hemorragia em altura

Objetivo. As mudanças bruscas de pressão atmosférica poderão gerar mudanças vasculares na retina. A continuação se propõe apresentar um caso clínico e revisar sua potencial fisiopatologia.

Métodos. Apresentação do caso com busca bibliográfica e atualização do tema.

Resultados. Paciente masculino de 36 anos de idade concorre a consulta com diminuição brusca da visão no olho direito associada à perda do conhecimento durante a ascensão a uma montanha. No exame oftalmológico se constata hemorragia macular associada com hemorragias difusas no olho direito e no esquerdo, hemorragias em chama nas arcadas vasculares. Após um ano o paciente regresa à consulta e se constata reso-

lução espontânea *ad integrum* das hemorragias em ambos os olhos.

Conclusão. A doença aguda da montanha se manifesta em pessoas não aclimatadas. As alterações na pressão atmosférica gerariam redução da pressão parcial de oxigênio sanguíneo, pelo qual se gerariam em nível ocular uma série de alterações vasculares na retina. Estas alterações se reduzem em frequência se existe um período de adaptação durante a ascensão. A presença de retinopatia da altura alerta também sobre a possibilidade de desenvolver doença cerebral relacionada com a altura.

Control del secretoma senescente por activadores de sirtuinas en células del epitelio pigmentario de la retina

Marazita MC, Tate P, Marquioni-Ramella M, Suburo AM
Laboratorio de Medicina Molecular y Celular, IIMT-CONICET, Universidad Austral, Pilar, Argentina.
mariemarazita@gmail.com

Introducción. El mecanismo de senescencia celular prematura gatilla la expresión de numerosos factores inflamatorios (*senescence associated secretory phenotype*, SASP) que podrían contribuir en la degeneración tisular característica de las enfermedades del envejecimiento. La degeneración macular asociada con la edad (DMAE) es una de las principales causas de discapacidad visual irreversible en mayores de 65 años. Hemos descrito que la activación de senescencia celular prematura por daño oxidativo desregula en células del epitelio pigmentario de la retina la expresión de factores centrales en la progresión de la AMD. Postulamos que las sirtuinas 1 y 3 (SIRT1, SIRT3) —enzimas desacetilasas dependientes de NAD⁺ y con un rol clave en la respuesta al estrés y al envejecimiento— pueden modular el SASP.

Objetivo. El objetivo del trabajo consistió en estudiar el efecto del ácido nicotínico (NA), un precursor de NAD⁺, y de ácido cafeico (CAF), un polifenol con propiedades anti-inflamatorias, sobre las sirtuinas y el secretoma senescente en células del epitelio pigmentario de la retina ARPE-19.

Metodología. Se incubaron células ARPE-19 con H₂O₂ 200 μM por 90 minutos durante 3 días

y luego se mantuvieron en medio fresco por 7 días. Los cultivos se expusieron a 1 mM NA o a 6 μg/ml CAF por 8 días. Los niveles de ARNm para IL-8, SIRT1, SIRT3 se estudiaron por PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR). La inducción de senescencia se estudió mediante la detección de la actividad de b-galactosidasa (SA-β-gal+).

Resultados. Tanto NA como CAF aumentaron significativamente la expresión de SIRT3 y SIRT1 respectivamente en comparación con cultivos senescentes no tratados. Ambos compuestos disminuyeron significativamente los niveles de ARNm de IL-8, componente característicos del SASP. No se observó disminución del número de células SA-β-gal+.

Conclusiones. NA y CAF, que modifican la expresión de sirtuinas, disminuyen un componente clave del SASP sin alterar el estado senescente. La modulación de SIRT1/3 podría ser un nuevo blanco para limitar los efectos del secretoma senescente en la retina.

Senescence secretome control using sirtuin activators in retinal pigment epithelium cells

Introduction. The mechanism of early cellular senescence triggers the expression of many inflammatory factors (*senescence-associated secretory phenotype*, SASP) that might contribute to the tissue degeneration typically found in ageing diseases. Age-related macular degeneration (ARMD) is one of the main causes of irreversible visual disability in individuals older than 65 years. We have described that in retinal pigment epithelium cells early cell senescence activation by oxidative damage dysregulates the expression of factors that are central to ARMD progression. We here postulate that sirtuins 1 and 3 (SIRT1, SIRT3) —NAD⁺-dependent desacetylase enzymes having a key role in the response to stress and ageing— may modulate SASP.

Objective. The purpose of this paper was to study the effect of nicotinic acid (NA), a NAD⁺ precursor, and of caffeic acid (CAF), a polyphenol with anti-inflammatory properties on sirtuins and senescence secretome in retinal pigment epithelium cells (ARPE-19).

Methodology. ARPE-19 cells were incubated with 200 μM H_2O_2 for 90 minutes during 3 days and maintained in a fresh medium for 7 days. Cultures were exposed to 1 mM NA or 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ CAF for 8 days. mRNA levels for IL-8, SIRT1, SIRT3 were studied by real-time quantitative PCR (qPCR). Senescence induction was evaluated by beta-galactosidase activity detection (SA-beta-gal+).

Results. Both NA and CAF significantly increased the expression of SIRT3 and SIRT1, respectively vs. untreated senescent cultures. In addition, both compounds significantly reduced the levels of mRNA for IL-8, a characteristic component of SASP. There was no decrease in the number of SA-beta-gal+ cells.

Conclusions. NA and CAF, which modify the expression of sirtuins, reduce a key SASP component with no changes to the senescent state. SIRT1/3 modulation might be a new target to limit the effects of senescence secretomes in the retina.

Controle do secretoma senescente por ativadores de sirtuínas em células do epitélio pigmentar da retina

Introdução. O mecanismo de senescência celular prematura dispara a expressão de numerosos fatores inflamatórios (*senescence associated secretory phenotype*, SASP) que poderiam contribuir na degeneração tissular característica das doenças do envelhecimento. A degeneração macular associada com a idade (DMAE) é uma das principais causas de deficiência visual irreversível em maiores de 65 anos. Temos descrito que a ativação de senescência celular precoce por dano oxidativo desregula em células do epitélio pigmentar da retina a expressão de fatores centrais na progressão da AMD. Postulamos que as sirtuínas 1 e 3 (SIRT1, SIRT3) —enzimas desacetilases dependentes de NAD^+ e com um papel chave na resposta ao stress e ao envelhecimento— podem modular o SASP.

Objetivo. O objetivo do trabalho consistiu em estudar o efeito do ácido nicotínico (NA), um precursor de NAD^+ , e de ácido caféico (CAF), um polifenol com propriedades anti-inflamatórias,

sobre as sirtuínas e o secretoma senescente em células do epitélio pigmentar da retina ARPE-19.

Metodologia. Incubaram-se células ARPE-19 com H_2O_2 200 μM por 90 minutos durante 3 dias e depois foram mantidas em meio fresco por 7 dias. As culturas se expuseram a 1 mM NA ou a 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ CAF por 8 dias. Os níveis de ARNm para IL-8, SIRT1, SIRT3 se estudaram por PCR quantitativa em tempo real (qPCR). A indução de senescência se estudou mediante a detecção da atividade de b-galactosidase (SA- β -gal+).

Resultados. Tanto NA quanto CAF aumentaram significativamente a expressão de SIRT3 e SIRT1 respectivamente em comparação com culturas senescentes não tratados. Ambos os compostos diminuíram significativamente os níveis de ARNm de IL-8, componentes característicos do SASP. Não se observou diminuição do número de células SA- β -gal+.

Conclusões. NA e CAF, que modificam a expressão de sirtuínas, diminuem um componente chave do SASP sem alterar o estado senescente. A modulação de SIRT1/3 poderia ser um novo alvo para limitar os efeitos da secretoma senescente na retina.

Ganancia de contraste en funciones de inhibición de colores sobre umbrales de contraste de luminancia

Miquilini L^a, Sousa BRS^a, Barboni MTS^b, Nagy BV^b, Bonci DMO^b, Ventura DF^b, Souza GS^a

^a Universidade Federal do Pará, Belém, Brasil.

^b Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.
leticia.miquilini@gmail.com

Objetivo. Comparar la ganancia de contraste de mecanismos inhibitorios de colores sobre umbrales de luminancia.

Métodos. Se evaluaron 4 tricrómatas normales y 5 discromatópsicos congénitos (2 protan, 2 deutan y 1 tritan). El fenotipo de la visión de color se definió por el test CAD. El estímulo se formó por un mosaico de círculos de diez tamaños diferentes y se coloreó con una de las 10 cromaticidades dispuesta alrededor de la cromaticidad central ($u^* = 0,195$; $v^* = 0,464$) en el diagrama de CIE 1976. La disposición de cromaticidades utilizadas varió en tres condiciones diferentes: colores cerca de

las líneas de confusión protan, deutan y tritan. El ruido espacial de colores se cuantificó por el tamaño del vector que unía a cada uno de los colores al color central. Las magnitudes del ruido fueron 0,04, 0,02, 0,01 y 0,005. Una C de Landolt se difería del fondo por la diferencia de luminancia. La tarea del sujeto consistía en indicar verbalmente a la orientación de la apertura de la C (arriba, abajo, izquierda o derecha). La luminancia del estímulo se controló por procedimiento de elección forzada de cuatro opciones con la regla de 2 aciertos: 1 error. El test terminaba en 12 reversiones y se utilizó la media de las últimos 6 reversiones para determinar el contraste umbral. Una función potencia se utilizó para modelar los datos. El exponente de la función se consideró el indicador de la ganancia.

Resultados. En todas las condiciones, tricrómatas normales exhibieron exponentes positivos. El sujeto tritan tuvo exponentes positivos para las condiciones protan y deutan, pero para la condición tritan el exponente fue cero. Los sujetos protan presentaron exponentes negativos en las condiciones protan y deutan, pero en condición tritan uno de los sujetos presentó exponente positivo y el otro, negativo. Los sujetos deutan exhibieron exponentes negativos en condición protan y exponentes positivos en condiciones deutan y tritan. Las correlaciones entre exponentes estimados para condiciones protan y deutan y condiciones protan y tritan pueden separar los datos de los sujetos tricrómatas, protan y deutan en diferentes cuadrantes.

Conclusiones. La ganancia de contraste de funciones de inhibición de colores sobre contraste umbral de luminancia se puede usar para separar datos de diferentes fenotipos de visión de colores.

Contrast gain in chromatic inhibition functions on luminance contrast thresholds

Objective. To compare the contrast gain of chromatic inhibitory mechanisms on luminance thresholds.

Methods. Four normal trichromatic individuals and 5 subjects with congenital dyschromatopsia (2 protan, 2 deutan, 1 tritan individuals) were studied. The color vision phenotype was defined by the CAD test. The stimulus was formed by a circle mosaic of ten different sizes and colored with one of the 10 chromaticities arranged round the central chromaticity ($u' = 0.195$; $v' = 0.464$) by using the 1976 CIE diagram. Arrangement of the chromaticities used varied according to three different conditions: colors near the confusion lines for protan, deutan and tritan defects. Spatial chromatic noise was quantitated according to the size of the vector joining each color to the central color. Noise magnitudes were: 0.04, 0.02, 0.01 and 0.005. A Landolt C was discerned from the background because of the luminance difference. The subject's task consisted in verbally indicating the C gap-opening orientation (up, down, left or right). The stimulus luminance was controlled by the four-alternative forced-choice procedure using the 2 correct: 1 incorrect response rule. The test was finished with 12 reversals and the mean of the last 6 reversals was used to determine the contrast threshold. A power function was used for data modeling. The function exponent was considered as the gain indicator.

Results. For all conditions, normal trichromatic individuals exhibited positive exponents. The tritan subject had positive exponents for protan and deutan conditions, but for the tritan condition the exponent was zero. Negative exponents were observed in protan subjects under protan and deutan conditions, but in tritan conditions one of the subjects had a positive exponent and the other, a negative one. Deutan individuals evidenced negative exponents under protan conditions and positive exponents under deutan and tritan conditions. Estimated correlations between exponents for protan and deutan conditions, and for protan and tritan conditions can separate data from trichromatic, protan and deutan individuals in different quadrants.

Conclusions. Contrast gain of chromatic inhibitory functions on luminance contrast threshold can be used to separate data between different color vision phenotypes.

Ganho de contraste em funções de inibição de cores sobre limiares de contraste de luminância

Objetivo. Comparar o ganho de contraste de mecanismos inibitórios de cores sobre limiares de luminância.

Métodos. Avaliaram-se 4 tricrómatas normais e 5 discromatópsicos congênitos (2 protan, 2 deutan e 1 tritan). O fenótipo da visão de cor se definiu pelo teste CAD. O estímulo se formou por um mosaico de círculos de dez tamanhos diferentes e se coloriu com uma das 10 cromaticidades colocada ao redor da cromaticidade central ($u' = 0,195$; $v' = 0,464$) no diagrama de CIE 1976. A disposição de cromaticidades utilizadas variou em três condições diferentes: cores perto das linhas de confusão protan, deutan e tritan. O ruído espacial de cores se quantificou pelo tamanho do vector que unia a cada uma das cores à cor central. As magnitudes do ruído foram 0,04, 0,02, 0,01 e 0,005. Uma C de Landolt se diferia do fundo pela diferença de luminância. A tarefa do sujeito consistia em indicar verbalmente a orientação da abertura da C (acima, abaixo, esquerda ou direita). A luminância do estímulo se controlou por procedimento de eleição forçada de

quatro opções com a regra de 2 acertos: 1 erro. O teste terminava em 12 reversões e se utilizou a média das últimas 6 reversões para determinar o contraste limiar. Uma função potência se utilizou para modelar os dados. O expoente da função se considerou o indicador do ganho.

Resultados. Em todas as condições, tricrómatas normais exibiram expoentes positivos. O sujeito tritan teve expoentes positivos para as condições protan e deutan, mas para a condição tritan o expoente foi zero. Os sujeitos protan apresentaram expoentes negativos nas condições protan e deutan, mas em condição tritan um dos sujeitos apresentou expoente positivo e o outro, negativo. Os sujeitos deutan exibiram expoentes negativos em condição protan e expoentes positivos em condições deutan e tritan. As correlações entre expoentes estimados para condições protan e deutan e condições protan e tritan podem separar os dados dos sujeitos tricrómatas, protan e deutan em diferentes quadrantes.

Conclusões. O ganho de contraste de funções de inibição de cores sobre contraste limiar de luminância se pode usar para separar dados de diferentes fenótipos de visão de cores.