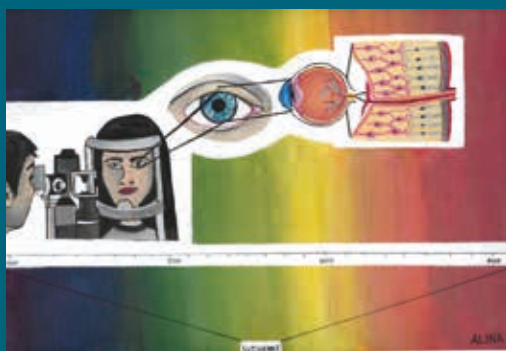


# Oftalmología Clínica y Experimental

Publicación científica del Consejo Argentino de Oftalmología • ISSN 1851-2658 • Volumen 11 • Suplemento • Diciembre 2018

Resúmenes del XII Congreso Nacional

**AIVO**



*Córdoba, Argentina, 26 y 27 de octubre de 2018*

OCE

11.S



# JÓVENES

## Beneficios, servicios y educación

Asociate al CAO y accedé a los mismos servicios que ofrecemos a los oftalmólogos especialistas.

- Cuota social bonificada.
- Curso de Simulación Virtual de Cirugía de Catarata.
- Carrera de Médico Especialista UBA-CAO.
- Congreso Rebecos.
- Curso del Cono Sur CAO-PAAO.
- Becas Rentadas.
- Búsquedas bibliográficas on line.
- Descuentos exclusivos en Educación CAO.

 (011) 4374-5400, int. 202

 [www.ofthalmologos.org.ar/jovenes](http://www.ofthalmologos.org.ar/jovenes)

 [administracion@oftalmologos.org.ar](mailto:administracion@oftalmologos.org.ar)

**CAO**  
JÓVENES

# Oftalmología Clínica y Experimental

Volumen 11 • Suplemento • Diciembre de 2018

## Sumario

### **Resúmenes de investigaciones presentadas en el XII Congreso nacional de la Asociación de Investigación en Visión y Oftalmología (AIVO)**

*Córdoba, 26 y 27 de octubre de 2018*

S1

### **Abstracts of research papers presented at the 12th National meeting of the "Asociación de Investigación en Visión y Oftalmología" (AIVO) [Association of Research in Vision and Ophthalmology]**

*Held in Córdoba, October 26th and 27th, 2018*

S1

### **Resumo das pesquisas apresentadas no XII Congresso nacional da Associação de Investigación en Visión y Oftalmología (AIVO) [Associação para Pesquisa em Visão e Oftalmologia]**

*Que se levaram a cabo em Córdoba, 26 e 27 de outubro de 2018*

S1

### **Indice de autores / Authors' index / Índice de autores**

S72

# Oftalmología Clínica y Experimental

La revista **Oftalmología Clínica y Experimental** (ISSN 1851-2658) tiene una frecuencia trimestral (cuatro números por año). Su objetivo es brindar acceso a material científico en español, en portugués y en inglés. Contiene trabajos originales de investigación clínico-quirúrgica y básica, comunicaciones breves, informe de casos y series, revisiones sistemáticas, apuntes en medicina basada en la evidencia, bioestadística y prevención de la ceguera, comentarios de resúmenes destacados para la práctica oftalmológica presentados en congresos y reuniones de la especialidad y referencias a publicaciones de otras revistas. Se estimula el envío de correspondencia para la sección de cartas de lectores abierta a todos los profesionales que deseen expresar sus comentarios sobre los trabajos publicados y observacio-

nes preliminares importantes para la práctica oftalmológica. Los trabajos recibidos son evaluados por profesionales (árbitros o revisores) con conocimiento del tema tratado de acuerdo con normas internacionales. La revista cuenta con un sistema de autoevaluación para contabilizar créditos de educación permanente. Los artículos podrán ser localizados e identificados a través de los buscadores usuales de la web abierta y bases de datos regionales.

El Comité Editorial de la revista adhiere a los principios establecidos por el Internacional Committee of Medical Journal Editors y se ajusta a los principios de la Declaración de Helsinki y a los principios de cuidados de animales para experimentación de la Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO).

## Equipo

### EDITOR EN JEFE

Dr. Javier Casiraghi

### EDITORES ASOCIADOS

Dra. Alejandra Carrasco (Mendoza)

Dr. Jeremías Galletti (C.A.B.A)

Dr. Andrés Lasave (Mar del Plata)

Dr. Tomás Ortiz Basso (La Pampa)

Dr. Ariel Schlaen (C.A.B.A)

Dr. Rodrigo M. Torres (Entre Ríos)

### COMITÉ EDITORIAL POR SECCIONES

#### Asociación de Investigación en Visión y Oftalmología (AIVO)

Dr. Luis Politi

#### Asociación Argentina de Glaucoma (ASAG)

Dr. Jorge F. Lynch

#### Centro Argentino de Estrabismo (CAE)

Dr. Fernando Prieto Díaz

#### Grupo Argentino de Uveítis (GAU)

Dr. Emilio Dodds

#### Sociedad Argentina de Córnea, Refractiva y Catarata (SACRYC)

Dra. Adriana Tytiun

#### Sociedad Argentina de Plástica Ocular (SAPO)

Dr. Carlos Mir

#### Sociedad Argentina de Retina y Vítreo (SARyV)

Dr. Mariano Irós

#### Sociedad Argentina de Superficie Ocular (SASO)

Dr. Rodrigo M. Torres

### COMITÉ EDITORIAL NACIONAL

Dr. Emiliano Becerra

Dr. Alejandro Berra

Dr. Cristóbal Couto

Dr. Pablo Chiaradía

Dr. Leonardo D'Alessandro

Dr. Juan E. Gallo

Dr. Pablo Larrea

Dr. Arturo Maldonado Bas

Dr. Alberto Naveyra

Dr. Javier Odoriz Polo

Dr. David Pelayes

Dra. Ruth Rosenstein

Dr. Fernando J. Scattini

Dra. Felisa Shokida

Dr. Julio Urrets Zavalía

Dr. Alejo Vercesi

Dr. Ricardo Wainsztein

Dr. Daniel Weil

### COMITÉ EDITORIAL INTERNACIONAL

Dr. J. Fernando Arévalo, Estados Unidos

Dr. Paulo Augusto de Arruda Mello, Brasil

Dr. Fernando Gómez Goyeneche, Colombia

Dr. Van C. Lansingh, Estados Unidos

Dr. Jesús Merayo Lloves, España

Dra. Elisabetta Miserocchi, Italia

Dra. Cristina Muccioli, Brasil

Dra. Claudia Murillo Correa, México

Dr. Miguel Pedroza Seres, México

Dra. Marlene Vogel G., Chile

### EDITORES EMÉRITOS

Dra. Myriam Berman

Dr. Alberto Ciancia

Dr. Enrique S. Malbran

Dr. Hugo Dionisio Nano

Dr. Israel Jaime Yankelevich

Dr. Jorge Zárate

### EQUIPO EDITORIAL

Lic. Raúl Escandar

Srta. Débora Paschetta

Prof. Sebastián Centurión

Lic. Jorge Martins

Lic. Myriam Tencha

Lic. Inés Ramírez Bosco



### COMITÉ EJECUTIVO 2018-2019

#### Presidente

Dr. Javier Casiraghi (Buenos Aires)

#### Vicepresidente

Dr. Fernando Suárez (Trelew)

#### Secretario

Dr. Gustavo Bodino (Buenos Aires)

#### Tesorero

Dr. Daniel Badoza (Buenos Aires)

#### Prosecretario

Dra. Isabel Fernández de Román (General Roca)

#### Protesorero

Dr. Andrés Bastián (Buenos Aires)

#### Primer vocal

Dr. Juan Sebastián Rivero (Córdoba)

#### Segundo vocal

Dr. Matko Vidosevich (Rosario)

#### Tercer vocal

Dr. Guillermo Magnano (Santa Fe)

#### Cuarto vocal

Dr. Ignacio Zeolite (Mendoza)

Domicilio editorial: Consejo Argentino de Oftalmología, Tte. Gral. J. D. Perón 1479, PB, 1037AAO Buenos Aires, Argentina. Teléfono: (54-11) 4374-5400 líneas rotativas. Correspondencia al editor: [secretaria@oftalmologos.org.ar](mailto:secretaria@oftalmologos.org.ar)

Número de propiedad intelectual en trámite. Impresión: Galtprinting, Ayolas 494, C1159AAB Buenos Aires, Argentina

### [www.oftalmologos.org.ar/oce/](http://www.oftalmologos.org.ar/oce/)

Propiedad intelectual: Ninguna parte de esta revista podrá ser reproducida por ningún medio, incluso electrónico, ni traducida a otros idiomas sin autorización escrita de sus editores. Los editores y miembros del comité asesor no tienen interés comercial, ni patrocinan o acreditan ninguno de los productos comerciales o procedimientos de diagnóstico o tratamiento mencionados en los artículos publicados.

ISSN 1851-2658

## Resúmenes de investigaciones presentadas en el XII Congreso nacional de la Asociación de Investigación en Visión y Oftalmología (AIVO)

Reunión conjunta con la Sociedad Argentina de Investigación en Neurociencias (SAN)

*Córdoba, 26 y 27 de octubre de 2018.*

*Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.*

---

Abstracts of research papers presented at the 12<sup>th</sup> National meeting of the “Asociación de Investigación en Visión y Oftalmología” (AIVO) [Association of Research in Vision and Ophthalmology]

Joint meeting with the “Sociedad Argentina de Investigación en Neurociencias” (SAN) [Argentine Society on Neuroscience Research]

*Held in Córdoba, October 26<sup>th</sup> and 27<sup>th</sup>, 2018*

*Faculty of Chemical Sciences, National University of Córdoba, Argentina.*

---

Resumo das pesquisas apresentadas no XII Congresso nacional da Associação de Investigación en Visión y Oftalmología (AIVO) [Associação para Pesquisa em Visão e Oftalmologia]

Reunião conjunta con Sociedade Argentina de Pesquisa em Neurociências (SAN)

*Que se levaram a cabo em Córdoba, 26 e 27 de outubro de 2018*

*Faculdade de Ciências Químicas da Universidade Nacional de Córdoba, Argentina.*

---

### Correspondencia

Dr. Luis Enrique Politi

Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca

(INIBIBB-CONICET)

Universidad Nacional del Sur

Camino La Carrindanga km 7

8000 Bahía Blanca

Tel. 0291 486-1201

inpoliti@criba.edu.ar

**Oftalmol Clin Exp** (ISSN 1851-2658)

2018; 11(S): S1-S71.

---

1

---

### Degeneraciones retinales: la conexión isoprenoide

Prof. Dr. Steven J. Fliesler

*Departments of Ophthalmology and Biochemistry and Graduate Program in Neurosciences, University at Buffalo, The State University of New York, and the VA Western New York Healthcare System, Buffalo VA Medical Center, Buffalo, NY (USA)*

La vía del mevalonato genera una cantidad de productos isoprenoides importantes desde el punto de vista biológico, incluyendo a los esteroides (por ejemplo: colesterol), las hormonas esteroides, los ácidos biliares, el dolicol y sus derivados, los isopre-

nil pirofosfatos y los compuestos relacionados biogénicamente. El colesterol —el producto cuantitativamente dominante en la vía— es un componente ubicuo de las membranas de casi todas las células y tejidos eucariotas, así como también de las lipoproteínas hematógenas. Sin embargo, si bien el colesterol es esencial para la viabilidad y la función normal de las eucariotas superiores, se asoció una abundancia excesiva de colesterol con enfermedades en el ser humano, que incluyen el mal de Alzheimer y la degeneración macular relacionada con la edad. De modo similar, una escasez de colesterol puede ser perjudicial e incluso letal. Por ello, una biosíntesis del colesterol deficiente puede llevar a una disrupción de la fisiología celular y sistémica y dar como resultado patologías significativas. Mediante el uso de un modelo en ratas que imita a una de estas enfermedades recesivas humanas (síndrome de Smith-Lemli-Optiz [SSLO]) se demostró que el bloqueo del último paso en la síntesis del colesterol produce una degeneración retinal progresiva e irreversible. Los estudios realizados en nuestro laboratorio indican que el mecanismo molecular subyacente a esta degeneración no se debe simplemente a una deficiencia del colesterol sino que más bien es de naturaleza compleja e involucra cambios lipídicos, proteómicos y genómicos marcados, incluyendo la oxidación de lípidos y proteínas. Por este motivo, la administración de colesterol exógeno como único tratamiento (el estándar actual en pacientes con SSLO) no constituye una estrategia terapéutica efectiva. Hemos planteado la hipótesis de que la administración de una combinación de antioxidantes y colesterol como suplemento prevendría o reduciría significativamente la severidad de la degeneración retinal en el modelo de ratas con SSLO. Esta predicción fue validada, lo cual brinda la prueba preliminar de eficacia necesaria para ser utilizada como guía en un ensayo clínico con base empírica para el desarrollo de una intervención terapéutica en el SSLO y enfermedades relacionadas.

#### Retinal degenerations: the isoprenoid connection

The mevalonate pathway generates a number of biologically important isoprenoid products, including sterols (e.g., cholesterol), steroid hor-

mones, bile acids, dolichol and its derivatives, isoprenylpyrophosphates, and biogenically related compounds. Cholesterol —quantitatively the dominant product of the pathway— is a ubiquitous component of the membranes of almost all eukaryotic cells and tissues, as well as of blood-borne lipoproteins. However, although cholesterol is essential for the viability and normal function of higher eukaryotes, an over-abundance of cholesterol has been associated with human disease, including Alzheimer's disease and age-related macular degeneration. Similarly, a paucity of cholesterol also can be deleterious, even lethal. Hence, defective cholesterol biosynthesis can lead to disruption of cellular and systemic physiology, resulting in profound pathologies. Using a rat model that mimics one such human recessive disease (Smith-Lemli-Optiz syndrome [SLOS]), it has been shown that blocking the last step in cholesterol synthesis causes a progressive and irreversible retinal degeneration. Studies in our lab indicate that the molecular mechanism underlying this degeneration is not simply due to cholesterol deficiency; rather, it is complex, involving marked lipidomic, proteomic, and genomic changes, including lipid and protein oxidation. Hence, providing exogenous cholesterol alone (the current standard of care for SLOS patients) is not an effective therapeutic strategy. We hypothesized that combined antioxidant-cholesterol supplementation should prevent or markedly reduce the severity of the retinal degeneration in the SLOS rat model. This prediction has been validated, providing the necessary proof-of-principle to guide an evidence-based clinical trial for developing an improved therapeutic intervention for SLOS and related diseases.

#### Degenerações retinianas: a conexão isoprenóide

A via do mevalonato gera uma quantidade de produtos isoprenóides importantes desde o ponto de vista biológico, incluindo aos esteróis (por exemplo: colesterol), os hormônios esteroides, os ácidos biliares, o dolicol e seus derivados, os isoprenil pirofosfatos e os compostos relacionados biogénicamente. O colesterol —o produto quantitativamente dominante na via— é um componente ubíquo das membranas de quase todas as

células e tecidos eucariotas, assim como também das lipoproteínas hematógenas. Porém, mesmo o colesterol resulte essencial para a viabilidade e função normal dos eucariotas superiores, uma abundancia excessiva de colesterol foi associada com doenças no ser humano, que incluem o mal de Alzheimer e a degeneração macular relacionada com a idade. Do mesmo modo, uma escassez de colesterol pode ser prejudicial e até letal. Por isso, uma biossíntese do colesterol deficiente pode levar a uma perturbação da fisiologia celular e sistémica e dar como resultado, patologias significativas. Graças ao uso de um modelo em ratos que imita uma destas doenças recessivas humanas (síndrome de Smith-Lemli-Optiz [SSLO]), se demostrou que o bloqueio do último passo na síntese do colesterol produz uma degeneração retiniana progresiva e irreversible. Os estudos realizados em nosso laboratório indicam que o mecanismo molecular subjacente a esta degeneração não é causada apenas por uma deficiência do colesterol, mas também é de natureza complexa e envolve mudanças lipidômicas, proteômicas e genômicas marcadas, incluindo a oxidação de lipidos e proteínas. Por esse motivo, a administração de colesterol exógeno como único tratamiento (o standard atual em pacientes com SSLO) não constitui uma estratégia terapêutica efetiva. Temos abordado a hipótese de que a administración de una combinación de antioxidantes e colesterol como suplemento poderia prevenir ou reducir significativamente a severidade da degeneração retiniana no modelo de ratos com SSLO. Esta predicción tem sido validada, o qual proporciona a prova preliminar de eficacia necessária para ser utilizada como guia em un ensaio clínico com base empírica para o desenvolvimento de uma intervenção terapêutica no SSLO e doenças relacionadas.

2

## Desarrollo de modelos de CGR para una mejor comprensión de la degeneración glaucomatosa y la regeneración terapéutica

Dr. Iqbal Ahmad

*Department of Ophthalmology and Visual Sciences, College of Public Health, University of Nebraska Medical Center, Omaha, Nebraska, USA.*

El glaucoma comprende un grupo complejo de enfermedades con un factor común por el cual las células ganglionares retinales (CGR) se degeneran y causan una ceguera irreversible. Dado que las CGR nacen en forma embrionaria y que el glaucoma es una enfermedad de comienzo tardío, nuestros conocimientos sobre la susceptibilidad de las CGR, que podrían facilitar el diagnóstico precoz y permitir un mejor manejo de la enfermedad, continúan siendo rudimentarios. En este trabajo evaluamos la hipótesis que sostiene que las CGR son intrínsecamente vulnerables a los factores de riesgo de glaucoma mediante el desarrollo de un modelo de CGR humanas utilizando la tecnología iPSC. Las líneas de iPSC se generaron en base a sangre periférica de donantes sanos y pacientes con glaucoma divididos en grupos por edad y género. Hemos observado que mediante nuestro protocolo específico según el estadio definido químicamente se logró una diferenciación directa de las iPSC, por la que se obtuvieron CGR al recapitular el mecanismo de desarrollo normal que incluyó la activación temporal y jerárquica de los factores de transcripción específicos de las CGR. Estas células mostraron perfiles morfológicos, funcionales y transcripcionales de CGR nativas. Lo que resulta más importante es que expresaron una batería de moléculas guías y sus procesos discriminaron entre células blanco específicas (colículo superior) y no específicas (colículo inferior). Éstas regeneraron sus axones en un modelo microfluídico de axotomía química con capacidad regeneradora regulada por las vías mTOR y/o IL-6. El modelo reveló que las iPSC derivadas de pacientes con glaucoma con el alelo de riesgo SIX6 (rs33912345; C>A; Asn141His) generaron CGR con una eficiencia menor respecto de los controles, lo cual demostró la presencia de anomalías del desarrollo a niveles morfológicos (neuritas más cortas y más simples), funcionales (propiedades electrofisiológicas inmaduras) y moleculares (reguladores de transcripción tales como los Meis1 y Hmaga2 y vías tales como la MTOR desregulados). En conjunto, nuestros resultados sugieren que la patología neural observada en el glaucoma del adulto puede tener un inicio durante el desa-

rollo y que debemos apuntar a los genes y vías desregulados identificados para poder lograr el diagnóstico precoz, hallar enfoques para prevenir la degeneración y para facilitar la regeneración terapéutica.

Modeling RGC development: insight into glaucomatous degeneration and therapeutic regeneration

Glaucoma is a complex group of diseases with a unifying theme where retinal ganglion cells (RGCs) degenerate leading to irreversible blindness. Since RGCs are born embryonically and glaucoma is a late onset disease our knowledge about RGC susceptibility, which may facilitate early diagnosis and better management of the disease, remains rudimentary. We are testing a hypothesis that RGCs are intrinsically vulnerable to glaucomatous risk factors by modeling human RGC development, using the iPSC technology. iPSC lines were generated from the peripheral blood of age- and sex-matched healthy donors and glaucoma patients. We observed that our stage-specific chemically defined protocol directly differentiated iPSCs into RGCs by recapitulating normal developmental mechanism that included temporal and hierarchical activation of RGC-specific transcription factors. These cells displayed morphological, functional, and transcriptional profiles of native RGCs. More importantly, they expressed a battery of guidance molecules and their processes discriminated between specific (superior colliculus) and non-specific (inferior colliculus) target cells. They regenerated their axons in a micro-fluidic model of chemical axotomy, their regenerative capacity regulated by mTOR and/or IL-6 pathways. The model revealed that iPSCs derived from glaucoma patients with SIX6 risk allele (rs33912345; C>A; Asn141His) generated RGCs at lower efficiency versus controls, demonstrating developmental abnormalities at morphological (shorter and simpler neurites), functional (immature electrophysiological properties) and molecular (dysregulated transcription regulators such as Meis1 and Hmga2 and pathways such as mTOR) levels. Together, our results suggest that the neural pathology observed in adult

glaucoma may have a developmental onset and the identified dysregulated genes and pathways may be targeted for early diagnosis, approaches to prevent degeneration, and to facilitate therapeutic regeneration.

Desenvolvimento de modelos de CGR para uma melhor compreensão da degeneração glaucomatosa e a regeneração terapêutica

O glaucoma compreende um grupo complexo de doenças com um fator comum pelo qual as células ganglionares retinianas (CGR) se degeneram e causam uma cegueira irreversível. Devido a que as CGR nascem em forma embrionária e que o glaucoma é uma doença de começo tardio, nossos conhecimentos sobre a susceptibilidade das CGR, que poderiam facilitar o diagnóstico precoce e permitir uma melhor manipulação da doença, continuam sendo rudimentares. Neste trabalho avaliamos a hipótese que sustente que as CGR são intrinsecamente vulneráveis aos fatores de risco de glaucoma por meio do desenvolvimento de um modelo de CGR humanas utilizando a tecnologia iPSC. As linhas de iPSC se geraram com base no sangue periférico de doadores sãos e pacientes com glaucoma divididos em grupos por idade e gênero. Temos observado que através de nosso protocolo específico segundo o estado definido quimicamente se obteve uma diferenciação direta das iPSC, pela que se obtiveram CGR ao recapitular o mecanismo de desenvolvimento normal que incluiu a ativação temporal e hierárquica dos fatores de transcrição específicos das CGR. Essas células mostraram perfis morfológicos, funcionais e transcripcionais de CGR nativas. O que resulta mais importante é que expressaram uma bateria de moléculas guias e seus processos discriminaram entre células alvo específicas (colículo superior) e não específicas (colículo inferior). Estas regeneraram seus axônios em um modelo microfluídico de axotomia química com capacidade regeneradora regulada pelas vias mTOR e/ou IL-6. O modelo revelou que as iPSC derivadas de pacientes com glaucoma com o alelo de risco SIX6 (rs33912345; C>A; Asn141His) geraram CGR com uma efi-



ciência menor respeito dos controles, o qual demonstrou a presença de anomalias do desenvolvimento a níveis morfológicos (neurites mais curtas e mais simples), funcionais (propriedades eletrofisiológicas imaturas) e moleculares (reguladores de transcrição tais como os Meis1 e Hmaga2 e vias tais como a MTOR desregulados). Em conjunto, nossos resultados sugerem que a patologia neural observada no glaucoma do adulto pode ter um início durante o desenvolvimento y que devemos apontar aos genes e vias desregulados identificados para obter o diagnóstico precoce, encontrar abordagens para prevenir a degeneração e para facilitar a regeneração terapêutica.

3

### **Células multipotentes como mediadoras de la regeneración de los nervios periféricos**

Dra. Patricia Setton  
IQUIFIB-CONICET-UBA, Buenos Aires, Argentina.

La desmielinización es una de las características distintivas del proceso de degeneración walleriana (DW) y la terapia celular se halla entre las estrategias en estudio para inducir la remielinización. Los resultados de nuestro grupo, obtenidos en un modelo reversible de DW inducida al aplastar el nervio ciático de la rata, demostraron la migración espontánea de células mononucleares de médula ósea (BMNC, por sus siglas en inglés) exclusivamente al nervio dañado. Una vez que se hallan en el nervio ipsilateral, algunas BMNC se ubican en la misma localización con marcadores de las células de Schwann y marcadores de fibras nerviosas. En este contexto, nuestro grupo se encuentra indagando en los efectos regenerativos de las BMNC y en el trasplante de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo en caso de lesiones en cuanto a morfología y función axonal, mejoría del dolor neuropático y los mecanismos subyacentes correspondientes. Asimismo, estamos realizando estudios en busca de optimizar el reclutamiento de las células al área de la lesión a través de recursos farmacológicos y nanotecnológicos. Hasta ahora, los resulta-

dos dejan entrever un papel beneficioso de las células multipotentes en las lesiones nerviosas y sugieren que éstas serían un adyuvante útil para los tratamientos con agentes antiinflamatorios/analgésicos.

Multipotent cells as mediators of peripheral nerve regeneration

Demyelination is one of the hallmarks of the Wallerian degeneration (WD) process and cell therapy is among the strategies under study to induce remyelination. Results from our group obtained in a reversible model of WD induced by the crush of the rat sciatic nerve demonstrated the spontaneous migration of endogenous or transplanted bone marrow mononuclear cells (BMNC) exclusively to the injured nerve. Once in the ipsilateral nerve, some BMNC colocalize with Schwann cell markers and nerve fiber markers. In this context, our group is currently digging into the regenerating effects of BMNC and adipose-derived mesenchymal stem cell transplant upon injury in terms of axon morphology and function, neuropathic pain amelioration and the corresponding underlying mechanisms. In addition, studies underway are seeking to optimize cell recruitment to the lesion area through pharmacological and nanotechnological resources. So far, results hint at a beneficial role for multipotent cells in nerve injury and suggest they could be useful adjuvants to anti-inflammatory/analgesic drug treatments.

Células multipotentes como mediadoras da regeneração dos nervos periféricos

A desmielinização é uma das características distintivas do processo de degeneração walleriana (DW) e a terapia celular está entre as estratégias em estudo para induzir a remielinização. Os resultados de nosso grupo, obtidos em um modelo reversível de DW induzida ao esmagar o nervo ciático do rato, demonstraram a migração espontânea de células mononucleares de medula ósea (BMNC, por suas siglas em inglês) exclusivamente ao nervo danado. Uma vez que se encontram no nervo ipsilateral, algumas BMNC

se localizam na mesma localização com marcadores das células de Schwann e marcadores de fibras nervosas. Neste contexto, nosso grupo se encontra indagando nos efeitos regenerativos das BMMC e no transplante de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo em caso de lesões em quanto a morfologia e função axoniana, melhora do dor neuropático e os mecanismos subjacentes correspondentes. Adicionalmente, estamos realizando estudos em busca de otimizar o recrutamento das células à área da lesão através de recursos farmacológicos e nanotecnológicos. Até agora, os resultados deixam entrever uma função benéfica das células multipotentes nas lesões nervosas e sugerem que estas seriam um adjuvante útil para os tratamentos com agentes anti-inflamatórios/analgésicos.

4

## Recableado funcional de la retina durante la regeneración retinal en el pez cebra

Dra. Deborah Stenkamp

Department of Biological Sciences, University of Idaho, Moscow, Idaho, USA.

Anteriormente hemos informado sobre la sorprendente presencia de morfologías normales y conectividades funcionales de neuronas bipolares (BP) retinales regeneradas en muestras de retinas de peces cebra, obtenidas luego de 60 días de producida una lesión de las neuronas retinales internas mediante inyecciones de ouabaína (60 dpi) [McGinn *et al.* *J Neurosci* 2018;38:120-136]. El objetivo de este trabajo es informar sobre los primeros pasos en el nacimiento de las BP y la formación de sus árboles y axones dendríticos en retinas regeneradas histológicamente luego de un daño retinal. Los peces cebra se sometieron a daño mediado por ouabaína, que destruye las neuronas retinales internas sin afectar a los fotorreceptores y células gliales de Müller, y se obtuvieron muestras a los 13, 17 y 21 dpi, un período durante el cual reemergen las capas plexiformes y que corresponde a la aparición y acumulación iniciales de dos poblaciones de BP (PKC $\alpha$ + y *nyx::mYFP*+). La incorporación secuencial de BrdU, luego EdU, revela que se generan fracciones similares de BP PKC $\alpha$ + y de células amácri-

mas/ganglionares Hu+ en los mismos tiempos, lo que sugiere que la secuencia de producción neuronal durante la regeneración retinal puede no coincidir estrictamente con la observada durante el desarrollo embrionario. Las BP *nyx::mYFP*+, que se hallan distribuidas en forma dispersa, se examinaron para evaluar el detalle morfológico mediante microscopía confocal, rastreo, análisis morfométricos, identificación de contactos sinápticos de los conos y procesamiento/visualización. Las neuritas con proyección apical (= dendritas) de las BP regeneradas, cuyas muestras se obtuvieron a los 13, 17 y 21 dpi, estaban truncas o bien tenían árboles dendríticos más pequeños en comparación con los controles. En los casos en que las dendritas de las BP llegaban a la capa plexiforme externa (CPE), la cantidad de extremos de dendritas eran similares a las que se encontraban en controles en todos los momentos puntuales de toma de muestras. Asimismo, a los 13-17 dpi, las BP mostraron patrones de conexiones de los fotorreceptores que no podían distinguirse estadísticamente de los controles, mientras que las muestras tomadas a los 21 dpi favorecían levemente a los contactos con terminales sinápticas de cono doble por sobre los de los conos sensibles al azul. Estos hallazgos sugieren que las dendritas de las BP regeneradas que llegan a la CPE establecen conectomas de fotorreceptores normales, aunque con cierta plasticidad. Al llegar a los 21 dpi se observaron neuritas con proyección basal (= axones) de BP *nyx::mYFP*+ regeneradas que atravesaban largas distancias, se ramificaban en capas inadecuadas o parecían terminar en forma abrupta, lo cual hacía que resultaran difíciles de rastrear. En conjunto, estos hallazgos sugieren que luego de una lesión que destruye a las BP y sus correspondientes pos-sinápticos, pero que no afecta a sus inputs presinápticos, se produce un enlentecimiento de la maduración y guía axonales de las BP regeneradas en comparación con la formación y maduración de sus árboles dendríticos.

Functionally re-wiring the retina during retinal regeneration in adult zebrafish

We previously reported strikingly normal morphologies and functional connectiv-

ities of regenerated retinal bipolar neurons (BPs) in zebrafish retinas sampled 60 days after a ouabain-mediated lesion of inner retinal neurons (60 dpi) [McGinn *et al. J Neurosci* 2018;38:120-136]. Here we report early steps in the birth of BPs and formation of their dendritic trees and axons in histologically regenerated retinas following retinal injury. Zebrafish were subjected to ouabain-mediated lesion that destroys inner retinal neurons and spares photoreceptors and Müller glia, and were sampled at 13, 17, and 21 dpi, a time frame over which plexiform layers re-emerge, and which corresponds to the initial appearance and accumulation of two populations of BPs (PKC $\alpha$ + and *nyx::mYFP*+). Sequential BrdU, then EdU, incorporation reveals that similar fractions of PKC $\alpha$ + BPs and Hu+ amacrine/ganglion cells are generated at the same times, suggesting that the sequence of neuronal production during retinal regeneration may not strictly match that observed during embryonic development. The sparsely distributed *nyx::mYFP*+ BPs were examined for morphological detail by confocal microscopy, tracing, morphometric analyses, identification of cone synaptic contacts, and rendering/visualization. Apically-projecting neurites (=dendrites) of regenerated BPs sampled at 13, 17, and 21 dpi are either truncated, or display smaller dendritic trees when compared to controls. In cases where BP dendrites reach the outer plexiform layer (OPL), numbers of dendritic tips are similar to those of controls at all sampling times. Further, by 13-17 dpi, BPs show patterns of photoreceptor connections that are statistically indistinguishable from controls, while those sampled at 21 dpi slightly favor contacts with double cone synaptic terminals over those of blue-sensitive cones. These findings suggest that dendrites of regenerated BPs that reach the OPL establish normal photoreceptor connectomes, albeit with some plasticity. Through 21 dpi, basally-projecting neurites (=axons) of regenerated *nyx::mYFP*+ BPs traverse long distances, branch into inappropriate layers, or appear to abruptly terminate, making them difficult to trace. Collectively, these findings suggest that, after a lesion that destroys BPs

and their postsynaptic partners, but spares their presynaptic inputs, maturation and pathfinding of regenerated BP axons are delayed compared to formation and maturation of their dendritic trees.

Nova fiação funcional da retina durante a regeneração retiniana no pez zebra

Anteriormente temos informado sobre a surpreendente presença de morfologias normais e conectividades funcionais de neurônios bipolares (BP) da retina regeneradas em amostras de retinas de pezes zebra, obtidas logo de 60 dias de produzida uma lesão dos neurônios da retina internos por meio de injeções de ouabaína (60 dpi) [McGinn *et al. J Neurosci* 2018;38:120-136]. O objetivo deste trabalho é informar sobre os primeiros passos no nascimento das BP e a formação de seus arvores y axônios dendríticos em retinas regeneradas histologicamente logo de um dano da retina. Os pezes zebra foram submetidos a dano mediado por ouabaína, que destrói os neurônios internos da retina sem afetar aos fotorreceptores e células gliais de Müller, e se obtiveram amostras aos 13, 17 e 21 dpi, um período durante o que reemergem as camadas plexiformes e que corresponde com a aparição e acumulação iniciais de duas populações de BP (PKC $\alpha$ + e *nyx::mYFP*+). A incorporação sequencial de BrdU, logo EdU, revela que se geram frações similares de BP PKC $\alpha$ + e de células amácrimas/ganglionares Hu+ nos mesmos tempos, o que sugere que a sequência de produção neuronal durante a regeneração da retina pode não coincidir estritamente com a observada durante o desenvolvimento embrionário. As BP *nyx::mYFP*+, que se encontram distribuídas em forma dispersa, foram examinadas para avaliar o detalhe morfológico através de microscopia confocal, rastreamento, análises morfométricas, identificação de contatos sinápticos dos cones e processamento/visualização. As neurites com projeção apical (= dendritos) das BP regeneradas, cujas amostras se obtiveram aos 13, 17 e 21 dpi, estavam truncados ou tinham árvores dendríticas mais pequenos em comparação com os controles. Nos casos em que

os dendritos das BP chegavam a camada plexiforme externa (CPE), a quantidade de extremos de dendritos era similar as que se encontravam nos controles em todos os momentos pontuais de toma de amostras. Também, aos 13-17 dpi, as BP mostraram padrões de conexões dos fotorreceptores que não podiam diferenciar-se estatisticamente dos controles, enquanto as amostras tomadas aos 21 dpi favoreciam ligeiramente aos contatos com terminais sinápticos de cone duplo por sobre os dos cones sensíveis a azul. Estes achados sugerem que os dendritos das BP regeneradas que chegam até a CPE estabelecem conectomas de fotorreceptores normais, embora com certa plasticidade. Ao alcançar os 21 dpi se observaram neurites com projeção basal (=axônios) de BP *nyx::mYFP+* regeneradas que atravessavam longas distancias, se ramificavam em camadas inadequadas ou pareciam terminar em forma abrupta, o que fazia com que resultaram difíceis de rastrear. No conjunto, estes achados sugerem que logo de uma lesão que destrói as BP e suas correspondentes pós-sinápticas, mas que não afeta seus inputs pré-sinápticos, se produz um atraso da maturação e guia dos axônios das BP regeneradas em comparação com a formação e maturação de suas árvores dendríticas.

5

### Organoides retinales 3D: nuevas fronteras para aplicaciones clínicas en base a células madre

Dra. Valeria Canto Soler  
3D Ret Lab, University of Colorado School of Medicine, USA.

Las células madre pluripotentes inducidas humanas (hiPSC, por sus siglas en inglés) ofrecen una herramienta única para el desarrollo de modelos *in vitro* de enfermedades retinales, así como para estrategias terapéuticas para regenerar la retina enferma. Recientemente se han logrado progresos en nuestra capacidad para generar tejidos retinales tridimensionales derivados de hiPSC que imitan con gran exactitud al microambiente y a la organización de los tejidos retinales y abren nuevas fronteras para su uso en aplicaciones clínicas. En esta charla se presentarán y analizarán los avances actuales en cuanto

a organoides retinales, explicaremos los desafíos y las oportunidades que presentan estos sistemas para la aplicación clínica y describiremos nuevos horizontes a los que apuntaremos en el contexto de enfoques terapéuticos potenciales.

3D retinal organoids: new frontiers for stem cell-based clinical applications

Human induced pluripotent stem cells (hiPSC) provide a unique tool for the development of *in vitro* models of retinal diseases as well as therapeutic strategies to regenerate the diseased retina. Recent progress in our ability to generate hiPSC-derived three dimensional retinal tissues that closely mimic the *in vivo* retinal microenvironment and tissue organization open new frontiers for their use in clinical applications. This talk will present and overview of the current-state-of-the art in retinal organoids; discuss the challenges and opportunities these systems present for clinical applications; and describe new directions being pursued in the context of potential therapeutic approaches.

Organoides da retina 3D: novas fronteiras para aplicações clínicas com base em células tronco

As células-tronco pluripotentes induzidas humanas (hiPSC, por suas siglas em inglês) oferecem uma ferramenta única para o desenvolvimento de modelos *in vitro* de doenças da retina, assim como para estratégias terapêuticas para regenerar a retina doente. Recentemente tem se ancorado progressos em nossa capacidade para gerar tecidos da retina tridimensionais derivados de hiPSC que imitam com grande exatidão ao microambiente e a organização dos tecidos da retina e abrem novas fronteiras para seu uso em aplicações clínicas. Nesta conversa se apresentaram e analisaram os avanços atuais referidos a organoides da retina, explicaremos os desafios y as oportunidades que apresentam estes sistemas para a aplicação clínica e descreveremos novos horizontes aos que apontaremos no contexto de abordagens terapêuticas potenciales.

## Neuroprotección de los fotorreceptores como estrategia terapéutica en la degeneración retinal

Dres. Thomas Cotter, Ani-Ruiz-Lopez, Ashley Byrne y Sarah Roche

*School of Biochemistry and Cell Biology, University College Cork, Ireland.*

t.cotter@ucc.ie

La retinitis pigmentosa (RP) es una enfermedad degenerativa que produce pérdida de células fotorreceptoras. Gracias a modelos murinos con RP, tales como los ratones rd10, ha mejorado nuestra comprensión de la enfermedad, lo que permitió el desarrollo de terapias potenciales. Nuestro grupo ha demostrado que el análogo de la progesterona sintético norgestrel tiene un efecto neuroprotector en dos modelos murinos de degeneración retinal. Hemos dilucidado varios mecanismos por los cuales el norgestrel protege a los fotorreceptores, tales como la regulación positiva de los factores de crecimiento y la disminución de la actividad de las células gliales. Esta presentación describe el mecanismo y la acción del norgestrel y sus efectos neuroprotectores. En el día posnatal (DP) 10 se les administró a las madres de crías rd10 una dieta suplementada con norgestrel (80mg/kg). Luego del destete, las crías continuaron recibiendo norgestrel. Se obtuvo tejido de ratones rd10 desde el DP 15 hasta el 50. La administración de una dieta con norgestrel brindó una protección retinal significativa a ratones al DP 40. Las alteraciones en la actividad microglial coincidieron con una protección significativa que implicó cambios microgliales en la neuroprotección inducida por el norgestrel. Mediante el uso de cultivos primarios de microglías retinales y células similares a los fotorreceptores 661W demostramos que las microglías de los rd10 conducen a la muerte de células neuronales. De este modo revelamos un papel novedoso del norgestrel al actuar directamente sobre las microglías para reducir la activación proinflamatoria y prevenir la muerte celular. El norgestrel logra una efectiva supresión de la expresión de la citoquina, la quemoquina y la molécula del patrón molecular asociado al peligro (DAMP, por sus

siglas en inglés) en la retina de los rd10. Cabe destacar que el norgestrel logra una regulación positiva 1000 veces mayor de la señalización de la fractalquina-CX3CR1 a nivel del ARN. Se ha demostrado que la señalización de la fractalquina-CX3CR1 protege a las neuronas al regular la activación y migración de la microglía retinal. Por último, estos resultados ubican al norgestrel como un tratamiento prometedor para la RP.

Neuroprotection of photoreceptors as a therapeutic strategy in retinal degeneration

Retinitis pigmentosa (RP) is a degenerative disease leading to photoreceptor cell loss. Mouse models of RP, such as the rd10 mouse have enhanced our understanding of the disease, allowing for development of potential therapeutics. Our group has demonstrated that the synthetic progesterone analogue norgestrel is neuroprotective in two mouse models of retinal degeneration. We have elucidated several mechanisms by which norgestrel protects photoreceptors, such as up-regulating growth factors and damping of glia cell activity. This presentation will outline the mechanism and action of norgestrel's neuroprotective effects. Dams of post-natal day (P) 10 rd10 pups were given a norgestrel-supplemented diet (80mg/kg). Upon weaning, pups remained on norgestrel. Tissue was harvested from P15-P50 rd10 mice. Norgestrel-diet administration provided significant retinal protection to P40 in mice. Alterations in microglial activity coincided with significant protection, implicating microglial changes in norgestrel-induced neuroprotection.

Utilizing primary cultures of retinal microglia and 661W photoreceptor-like cells, we show that rd10 microglia drive neuronal cell death. We reveal a novel role of norgestrel, acting directly on microglia to reduce pro-inflammatory activation and prevent cell death. Norgestrel effectively suppresses cytokine, chemokine and danger-associated molecular pattern molecule (DAMP) expression in the rd10 retina. Remarkably, norgestrel up-regulates fractalkine-CX3CR1 signalling 1000-fold at the RNA level. Fractalkine-CX3CR1 signaling has been

shown to protect neurons by regulating retinal microglial activation and migration. Ultimately, these results present norgestrel as a promising treatment for RP.

Neuroproteção dos fotorreceptores como estratégia terapêutica na degeneração retiniana

A retinite pigmentosa (RP) é uma doença degenerativa que produz perda de células fotorreceptoras. Graças a modelos murinos com RP, tais como os ratos rd10, tem melhorado nossa compreensão da doença, o que permitiu o desenvolvimento de terapias potenciais. Nosso grupo tem demonstrado que o análogo da progesterona sintética norgestrel tem um efeito neuroprotetor em dois modelos murinos de degeneração da retina. Temos esclarecido vários mecanismos pelos quais o norgestrel protege aos fotorreceptores, tais como a regulação positiva dos fatores de crescimento e a diminuição da atividade das células gliais. Esta apresentação descreve o mecanismo e a ação do norgestrel e seus efeitos neuroprotetores. No dia pós-natal, se ministrou (DP) 10 as mães de crias rd10 uma dieta suplementada com norgestrel (80mg/kg). Logo do desmame, as crias continuaram recebendo norgestrel. Obteve-se tecido de ratos rd10 desde o DP 15 até o 50. A administração de uma dieta com norgestrel proporcionou uma proteção retiniana significativa a ratos ao DP 40. As alterações na atividade microglial coincidiram com uma proteção significativa que implicou mudanças microgliais na neuroproteção induzida pelo norgestrel. Através do uso de culturas primárias de microglias da retina e células similares aos fotorreceptores 661W demonstramos que as microglias dos rd10 conduzem à morte de células neuronais. Desta forma, revelamos um novo papel do norgestrel a atuar diretamente sobre as microglias para reduzir a ativação pró-inflamatória e prevenir a morte celular. O norgestrel consegue uma efetiva supressão da expressão da citocina, a quemoquina e a molécula do padrão molecular associado ao perigo (DAMP, por suas siglas em inglês) na retina dos rd10. É preciso mencionar que o norgestrel consegue uma regulação positiva 1000 vezes maior da sinalização da fractalquina-CX3CR1 a nível do ARN. Tem se demonstrado

que a sinalização da fractalquina-CX3CR1 protege os neurônios ao regular a ativação e migração da microglia da retina. Por último, estes resultados colocam ao norgestrel na posição de um tratamento promissor para a RP.

---

7

---

## Alteraciones vasculares y no vasculares en las retinopatías: hacia un cambio en la estrategia terapéutica

Sánchez MC<sup>a</sup>, Ridano ME<sup>a</sup>, Subirada PV<sup>a</sup>, Paz MC<sup>a</sup>, Lorenc VE<sup>a,c</sup>, Luna JD<sup>b</sup>, Barcelona PF<sup>a</sup>, Vaglianti MV<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.

<sup>b</sup> Centro Privado de Ojos Romagosa-Fundación VER, Córdoba, Argentina.

<sup>c</sup> Department of Ophthalmology, The Johns Hopkins School of Medicine, Baltimore, USA.

Las retinopatías neovasculares son las principales causas de ceguera irreversible. Si bien los inhibidores del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, por sus siglas en inglés) se han transformado en el pilar principal del tratamiento actual, el manejo clínico de estas enfermedades aún resulta limitado. Como el deterioro retinal implica una neovascularización y degeneración neuronal anormales, el presente trabajo evalúa la funcionalidad retinal y el comportamiento de los marcadores de daño neuroglial utilizando el modelo de retinopatía inducida por oxígeno (RIO) en ratones tratados o no con anticuerpos monoclonales (mAb) anti-VEGF.

Las retinas de ratones de 17 días posnatales (DP) con RIO mostraron el perfil neovascular más alto y se observaron alteraciones neurogliales, así como también pérdida funcional que persistió hasta el DP26 de la RIO. Cabe destacar que el tratamiento con anti-VEGF en la RIO a los DP17 mejoró la vascularización retinal y no se atenuaron ni las alteraciones no vasculares ni las funcionales. Estos resultados sugieren que, además de la neovascularización, la neurodegeneración también debería considerarse como un importante componente patogénico de la enfermedad, resaltando la importancia de las alteraciones no vasculares en las

retinopatías proliferativas, así como la necesidad de buscar nuevos agentes terapéuticos que apunten tanto a los procesos neovasculares como a los neurodegenerativos para tratar esta enfermedad multifactorial.

Vascular and non-vascular alterations in retinopathies: towards a change in the therapeutic strategy

Neovascular retinopathies are leading causes of irreversible blindness. Although vascular endothelial growth factor (VEGF) inhibitors have been established as the mainstay of current treatment, clinical management of these diseases is still limited. As retinal impairment involves abnormal neovascularization and neuronal degeneration, we evaluated here the retinal functionality and the behavior of neuro-glial injury markers using the oxygen-induced retinopathy (OIR) model in mice treated or not with anti-VEGF mAb.

Postnatal day 17 OIR mouse retinas showed the highest neovascular profile and exhibited neuro-glial alterations as well as retinal functional loss, which persisted until P26 OIR. Remarkably, although anti-VEGF treatment in P17 OIR improved retinal vascularization, neither non-vascular nor functional alterations were attenuated. These results suggest that, in addition to neovascularization, retinal neurodegeneration should also be considered an important pathogenic component of the disease. This highlights the importance of non-vascular alterations in proliferative retinopathies and the need of seeking new therapeutic agents targeting both neovascular and neurodegenerative processes to treat this multifactorial disease.

Alterações vasculares e não vasculares nas retinopatias: para uma mudança na estratégia terapêutica

As retinopatias neovasculares são as principais causas de cegueira irreversível. Embora os inibidores do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF, por suas siglas em inglês) tem se transformado no pilar principal do tratamento atual, a gestão clínica destas doenças ainda resulta limitado. Como a deterioração da retina implica uma neovascularização e degeneração neuronal anor-

mais, o presente trabalho avalia a funcionalidade da retina e o comportamento dos marcadores de dano neuroglial utilizando o modelo de retinopatia induzida por oxigênio (RIO) em ratos tratados ou não com anticorpos monoclonais (mAb) anti-VEGF.

As retinas de ratos de 17 dias pós-natais (DP) com RIO mostraram o perfil neovascular mais alto e se observaram alterações neurogliais, assim como também, perda funcional, que persistiu até o DP26 da RIO. Cabe destacar que o tratamento com anti-VEGF na RIO aos DP17 melhorou a vascularização da retina e não se atenuaram nem as alterações não vasculares nem as funcionais. Estes resultados sugerem que, além da neovascularização, a neurodegeneração também deveria considerar-se como um importante componente patogênico da doença, destacando a importância das alterações não vasculares nas retinopatias proliferativas, assim como a necessidade de procurar novos agentes terapêuticos que apontem tanto aos processos neovasculares quanto aos neurodegenerativos para tratar esta doença multifatorial.

## Mecanismos moleculares de los péptidos PEDF en degeneraciones retinales

Dra. Patricia Becerra S.

National Eye Institute, National Institutes of Health, Bethesda, USA.  
becerras@nei.nih.gov

La generación de péptidos retinoprotectores que activan blancos específicos y selectivos en el ojo despierta gran interés debido a su alto valor terapéutico potencial en las distrofias retinales. Las ya reconocidas acciones del factor derivado del epitelio pigmentario (PEDF, por sus siglas en inglés) y su participación en el control de la homeostasis de la retina hacen que esta proteína sea la candidata perfecta para aplicaciones terapéuticas oculares futuras. El PEDF ejerce efectos neurotróficos, neuroprotectores, antiangiogénicos, gliastáticos, antioxidantes y antiangiogénicos en la retina. Asimismo, protege a la retina de los procesos de degeneración inducidos por la muerte celular, la neovascularización patológica, la tumorigénesis y la inflamación. Los estudios de la estructura y función de la proteína han demostrado que los

múltiples efectos del PEDF se basan en epítomos específicos distribuidos por toda la proteína y en interacciones con varios blancos, incluyendo los receptores de superficie específicos, los receptores huérfanos y otras proteínas. El mapeo de las regiones activas biológicas ha hecho posible que se aislen actividades individuales y específicas de esta proteína multifuncional. La fragmentación de la proteína y la síntesis del péptido químico han sido utilizados en el diseño de pequeños péptidos que han conservado actividades independientes del PEDF *in cellulo*, *ex vivo* e *in vivo*. Los péptidos de 17 residuos diseñados a partir del dominio neurotrófico del PEDF recapitulan las propiedades de su proteína completa de aproximadamente 400 residuos. Éstos impiden la muerte de las células fotorreceptoras al unirse al receptor del PEDF y estimulan su actividad fosfolipasa para liberar ácidos grasos de los fosfolípidos, los que, a su vez, actúan sobre las cascadas de señalización corriente abajo. Nuestros hallazgos señalan que los péptidos PEDF neurotróficos actúan a través del receptor del PEDF sobre la extrusión de calcio intracelular, la atenuación de la actividad de las calpaínas y la regulación de Bcl2, Bax y Aif para la supervivencia del fotorreceptor. En este trabajo hablaremos sobre el conocimiento actual de los mecanismos moleculares del PEDF.

El presente trabajo contó con el apoyo parcial del Intramural Research Program del National Eye Institute, National Institutes of Health.

#### Molecular mechanisms of PEDF peptides in retinal degenerations

The generation of retinoprotective peptides that activate specific and selective targets in the eye is of interest due to their high potential therapeutic value in retinal dystrophies. The well-established actions of pigment epithelium-derived factor (PEDF) and its involvement in controlling retina homeostasis make this protein a prime candidate for future ocular therapeutic applications. PEDF exerts neurotrophic, neuroprotective, antiangiogenic, gliastatic, antioxidant and antiangiogenic effects in the retina. It protects the retina from degeneration processes induced by cell death, pathological neovascularization, tumorigenesis

and inflammation. Studies on protein structure and function have demonstrated that the multiple actions of PEDF rely on specific epitopes distributed throughout the protein and interactions with several targets, including specific surface receptors, orphan receptors or other proteins. Mapping of the biological active regions has made possible the isolation of individual and specific activities of this multifunctional protein. Protein fragmentation and chemical peptide synthesis have been employed in the design of small peptides that have retained independent activities of PEDF *in cellulo*, *ex vivo* and *in vivo*. Peptides of 17 residues designed from the PEDF neurotrophic domain recapitulate the properties of its full-length protein of about 400 residues. They hinder photoreceptor cell death by binding the PEDF receptor and stimulating its phospholipase activity to liberate fatty acids from phospholipids, which in turn act on downstream signaling cascades. Our findings point out that the neurotrophic PEDF peptides act via the PEDF receptor on extrusion of intracellular calcium, attenuation of calpain activity and regulation of Bcl2, Bax, and Aif for photoreceptor survival. The current knowledge of the molecular mechanisms of PEDF will be discussed.

This work was supported in part by the Intramural Research Program of the National Eye Institute, National Institutes of Health.

#### Mecanismos moleculares dos péptidos PEDF em degenerações retinianas

A geração de péptidos retinoprotetores que ativam alvos específicos e seletivos no olho desperta grande interesse devido a seu alto valor terapêutico potencial nas distrofias da retina. As já reconhecidas ações do fator derivado do epitélio pigmentar (PEDF, por suas siglas em inglês) e sua participação no controle da homeostase da retina fazem com que esta proteína seja a candidata perfeita para aplicações terapêuticas oculares futuras. O PEDF exerce efeitos neurotróficos, neuroprotetores, antiangiogênicos, gliastáticos, antioxidantes e antiangiogênicos na retina. Da mesma forma, protege a retina dos processos de degeneração induzidos pela morte celular, a neovascularização patológica, a tumorigênese e a inflamação. Os estudos da



estrutura e a função da proteína tem demonstrado que os múltiplos efeitos do PEDF se baseiam em epítomos específicos distribuídos por toda a proteína e em interações com vários alvos, incluindo os receptores de superfície específicos, os receptores órfãos e outras proteínas. O mapeamento das regiões ativas biológicas tem feito possível que se isole atividades individuais e específicas desta proteína multifuncional. A fragmentação da proteína e a síntese do péptido químico tem sido utilizado no desenho de pequenos péptidos que tem conservado atividades independentes do PEDF *in cellulo*, *ex vivo* e *in vivo*. Os péptidos de 17 resíduos desenhados a partir do domínio neurotrófico do PEDF recapitulam as propriedades de sua proteína completa de aproximadamente 400 resíduos. Estes impedem a morte das células fotorreceptoras ao unir-se ao receptor do PEDF e estimulam sua atividade fosfolipase para liberar ácidos grasos dos fosfolípidos, os que, a sua vez, atuam sobre as cascatas de sinalização corrente abaixo. Nossos achados sinalam que os péptidos PEDF neurotróficos atuam através do receptor do PDEF sobre a extrusão de cálcio intracelular, a atenuação da atividade das calpaínas e a regulação de Bcl2, Bax e Aif para a supervivência do fotorreceptor. Neste trabalho vamos falar sobre o conhecimento atual dos mecanismos moleculares do PEDF.

O presente trabalho contou com o apoio parcial do Intramural Research Program do National Eye Institute, National Institutes of Health.

---

9

### **Análisis de la diversidad celular de la coroides/EPR utilizando secuenciación de ARN de célula única: implicancias para la homeostasis coroidea y la patogénesis y tratamiento de la DME**

Rodríguez-Boulan E<sup>a</sup>, Lehmann GL<sup>a</sup>, Hanke-Gogokhia C<sup>a</sup>, Hu Y<sup>b</sup>, Bareja R<sup>b</sup>, Ginsberg M<sup>c</sup>, Nolan DJ<sup>c</sup>, Wojcinsk A<sup>d</sup>, Elemento O<sup>b</sup>, Joyner AL<sup>d</sup>, Rafii S<sup>e</sup>, Benedicto I<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Margaret M. Dyson Vision Research Institute, Weill Cornell Medicine (WCM), New York, USA.

<sup>b</sup> Department of Physiology, Weill Cornell Medicine (WCM), New York, USA.

<sup>c</sup> Angiocrine Biosciences, San Diego, California, USA.

<sup>d</sup> Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, USA.

<sup>e</sup> Regenerative Medicine, Department of Medicine, Weill Cornell Medicine (WCM), New York, USA.

La coroides es una capa del ojo muy vascularizada que se ubica entre la esclera y el epitelio pigmentario de la retina (EPR). El suministro de sangre por circulación coroidea es la principal fuente de oxígeno y nutrientes para el EPR y los fotorreceptores, así como también la principal vía de evacuación de desechos retinales. Sin embargo, las células endoteliales microvasculares (CE) no son meros conductos pasivos en el aporte de sangre, sino que también desempeñan funciones específicas de los tejidos al ofrecer series de factores angiocrinos muy especializados en diferentes sitios del organismo, que mantienen la homeostasis tisular. No obstante esto, aún se desconoce el repertorio específico de factores expresados por las CE coroideas y la identidad de sus células blanco. Asimismo, el papel potencial de tal interferencia intercelular en la homeostasis coroidea no se ha estudiado hasta el momento. En este trabajo informamos los resultados del primer análisis de secuenciación de ARN de célula única de tejido de EPR/coroides de ratón adulto, identificándose 13 tipos de células principales, entre las que se incluyeron 3 subtipos de CE. Al combinar estos resultados con un análisis transcriptómico de CE específicas del tejido, hallamos un enriquecimiento importante de la expresión del erizo indio en CE coroideas, especialmente aquellas localizadas en aposición cercana con el EPR. Utilizando ratones reporteros, identificamos el blanco de señalización del Erizo (Hh, por sus siglas en inglés) de la coroides como una gran población de células similares a las células madre mesenquimales GLI1+ perivasculares estromales. La estimulación de células coroideas GLI1+ aisladas con un agonista del Hh indujo cambios transcripcionales profundos relacionados con la respuesta inmune. De hecho, la manipulación genética de la vía del Hh *in vivo* produjo una pérdida significativa de mastocitos coroideos, una respuesta inflamatoria alterada y un deterioro de la función visual luego del daño retinal. En resumen, por primera vez hemos logrado ofrecer un panorama celular y molecular integral de la coroides del ratón adulto. Asimismo, nuestros estudios han revelado la existencia de un circuito de señalización inmunomoduladora

mediado por el Hh originado en CE coroideas que puede abrir nuevas vías terapéuticas para las alteraciones coroideas y retinales relacionadas con el sistema inmune, tales como la DME.

Analysis of choroid/RPE cell diversity using single cell RNA sequencing: implications for choroid homeostasis and the pathogenesis and treatment of AMD

The choroid is a highly vascularized layer of the eye localized between the sclera and the retinal pigment epithelium (RPE). Blood supplied by choroidal circulation is the main source of oxygen and nutrients for RPE and photoreceptors, as well as the main evacuation route for retinal waste. However, microvascular endothelial cells (ECs) are not just passive conduits for delivering blood. Rather, ECs also play tissue-specific functions by providing highly specialized sets of angiocrine factors at different body locations that maintain tissue homeostasis. However, the specific repertoire of factors expressed by choroid ECs and the identity of their target cells remain unknown. Moreover, the potential role of such intercellular cross-talk in choroid homeostasis has not been studied so far. Herein, we report the first single cell RNAseq analysis of adult mouse RPE/choroid tissue, identifying 13 main cell types including 3 subtypes of ECs. By combining these results with a transcriptomic analysis of tissue-specific ECs, we found a marked enrichment of Indian Hedgehog expression in choroid ECs, particularly in those located in close apposition to the RPE. Using reporter mice, we identified the target of choroidal Hedgehog (Hh) signaling as a large population of stromal, GLI1<sup>+</sup> perivascular mesenchymal stem cell-like cells. Stimulation of isolated GLI1<sup>+</sup> choroidal cells with a Hh agonist induced profound transcriptional changes related to immune response. Indeed, genetic manipulation of the Hh pathway *in vivo* resulted in significant loss of choroidal mast cells, altered inflammatory response and impaired visual function after retinal damage. In sum, we provide for the first time a comprehensive cellular and molecular landscape of the adult mouse choroid. Moreover, our studies have uncovered

a Hh-mediated immunomodulatory signaling circuit originated in choroid ECs that may open new therapeutic avenues for immune-related choroidal and retinal disorders, such as AMD.

Análise da diversidade celular da coroide/EPR utilizando sequenciação de ARN de célula única: implicações para a homeostase coroide e a patogênese e tratamento da DME

A coroides é uma camada do olho muito vascularizada que se localiza entre a esclera e o epitélio pigmentar da retina (EPR). O subministro de sangue por circulação coroide é a principal fonte de oxigênio e nutrientes para o EPR e os fotorreceptores e também, a principal via de evacuação de resíduos da retina. Porém, as células endoteliais microvasculares (CE) não são simples condutos passivos na contribuição de sangue, senão que também desempenham funções específicas dos tecidos ao oferecer séries de fatores angiócrinos muito especializados em diferentes sítios do organismo, que mantem a homeostase tissular. Mesmo assim, ainda se desconhece o repertório específico de fatores expressados pelas CE da coroide e a identidade de suas células alvo. Do mesmo modo, o papel potencial de tal interferência intercelular na homeostase coroide não tem se estudado até o momento. Neste trabalho informamos os resultados da primeira análise de sequenciação de ARN de célula única de tecido de EPR/coroide de rato adulto, identificando-se 13 tipos de células principais, entre as que foram incluídos 3 subtipos de CE. Ao combinar estes resultados com uma análise transcriptômica de CE específicas do tecido, achamos um enriquecimento importante da expressão do ouriço da Índia em CE da coroide, especialmente aquelas localizadas em aposição próxima ao EPR. Utilizando ratos repórteres, identificamos o alvo de sinalização do ouriço (Hh, por suas siglas em inglês) da coroide como uma grande população de células similares às células-tronco mesenquimais GLI1<sup>+</sup> perivasculares estromais. A estimulação de células coroides GLI1<sup>+</sup> isolada com um agonista do Hh induziu mudanças transcricionais profundas relacionados com a resposta imune. De fato,

a manipulação genética da via do Hh *in vivo* produziu uma perda significativa de mastócitos coroides, uma resposta inflamatória alterada e um deterioro da função visual logo do dano da retina. Em resumo, pela primeira vez temos conseguido oferecer um panorama celular e molecular integral da coróide do rato adulto. Nossos estudos também têm revelado a existência de um circuito de sinalização imunomoduladora mediado pelo Hh originado em CE coróideas que pode abrir novas vias terapêuticas para as alterações coróideas e da retina relacionadas com o sistema imune, tais como a DME.

10

### Acerca de susceptibilidad particular de la mácula a la degeneración macular asociada a la edad no exudativa

Dorfman D, Diéguez HH, Romeo HH, Alaimo A, González Fleitas MF, Aranda ML, Sande PH, Rosenstein RE.

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

**Introducción.** La degeneración macular asociada a la edad no exudativa (AMDS) es la causa principal de ceguera en adultos mayores de 50 años y se caracteriza por la atrofia del epitelio pigmentario retinal (EPR) y fotorreceptores (FR) exclusivamente en la mácula. El EPR macular se encuentra expuesto a un ambiente oxidante asociado a la demanda metabólica, niveles elevados de especies reactivas de oxígeno y el flujo coróideo macular. Se ha sugerido que el daño oxidativo del EPR macular podría estar involucrado en los mecanismos patogénicos de la AMDS. El hecho de que sólo la mácula sea afectada por la AMDS, mientras que —al menos clínicamente— el resto de la retina permanece intacta, aun en etapas tardías de la enfermedad, plantea la pregunta de por qué la mácula es particularmente susceptible al daño por AMDS. Los modelos existentes de AMDS no reproducen las características centrales de la enfermedad humana. Recientemente desarrollamos un modelo AMDS inducido por gangliectomía cervical superior (GCSx) en ratones C57BL/6J, que reproduce las características principales de la

enfermedad, principalmente la localización de los daños, circunscriptos al EPR/retina neural central temporal.

**Objetivo.** En este contexto, el objetivo de este trabajo fue analizar las diferencias regionales en el sistema antioxidante endógeno, el estatus mitocondrial y la estructura del EPR de animales naïve y luego de GCSx que pudieran explicar la susceptibilidad localizada frente a AMDS.

**Métodos.** Se utilizaron ratones C57/BL6 macho adultos naïve y luego de 6 semanas posGCSx unilateral. En estos últimos, el lado contralateral fue sometido a un procedimiento simulado. En EPR nasal y temporal se analizaron el contenido de melanina (histología), los niveles de enzimas antioxidantes (*Western blot*) y la masa mitocondrial. Luego de 6 semanas pos-GCSx se evaluó la presencia de marcadores de daño oxidativo (4HNE, CML y MitoSOX), los niveles de enzimas antioxidantes y la masa mitocondrial.

**Resultados.** En el EPR temporal de animales naïve se encontró menor contenido de melanina, pliegues basales más altos, mayores niveles de enzimas antioxidantes y mayor masa mitocondrial respecto del EPR nasal. En el EPR temporal (pero no nasal) la GCSx indujo una disminución significativa en los niveles de enzimas antioxidantes, un incremento en marcadores de daño oxidativo y una disminución significativa en la masa mitocondrial.

**Conclusiones.** Estos resultados demuestran la presencia de diferencias estructurales y metabólicas entre la región nasal y temporal del EPR de animales naïve y efectos diferenciales de la GCSx sobre estos parámetros. Además, sugieren que podría no ser la fisiopatología de la AMDS sino la estructura y el metabolismo particular del EPR macular lo que condicione la localización de la enfermedad.

Regarding the particular susceptibility of the macula to non-exudative age-related macular degeneration

**Introduction.** Non-exudative age-related macular degeneration (AMD) is the main cause of blindness in adults over 50 years of age, and it is characterized by retinal pigment epithelium (RPE) and photoreceptor (PR) atrophy

exclusively in the macula. The macular RPE is exposed to an oxidative environment associated with the metabolic demand, and elevated levels of reactive oxygen species and macular chorioidal flow. It has been suggested that macular RPE oxidative damage might be involved in the pathogenic mechanisms of AMD. The fact that only the macula is affected by AMD, while the rest of the retina remains intact—at least clinically—even in the latest stages of the disease, poses the question of why the macula is particularly susceptible to damage caused by AMD. Available AMD models fail to reproduce the core features of the disease in humans. Recently, we have developed a model of AMD induced by superior cervical gangliectomy (SCGx) in C57BL/6J mice that reproduces the main features of the disease, mainly as to location of damage, which is circumscribed to the central temporal RPE/neural retina.

*Objective.* In this context, the goal of this paper was to analyze the regional differences in the endogenous antioxidant system, the mitochondrial status and the RPE structure that might account for the localized susceptibility to AMD in naive animals and after SCGx.

*Methods.* Two groups of male C57/BL6 mice were assessed: naive mice and mice that had undergone unilateral SCGx 6 weeks before. In the latter, the contralateral side was subjected to a simulated procedure. Melanin content (histology), antioxidant enzyme levels (Western blot) and mitochondrial mass were analyzed at the nasal and temporal RPE. Six weeks after SCGx, the presence of oxidative damage markers (4HNE, CML and MitoSOX), antioxidant enzyme levels and mitochondrial mass were evaluated.

*Results.* In the temporal RPE of naive mice there was greater melanin content, higher basal infoldings, greater antioxidant enzyme levels and greater mitochondrial mass as compared to the nasal RPE. In the temporal RPE (though not in the nasal RPE), SCGx induced a significant reduction of antioxidant enzymes, an increase of oxidative damage markers and a significant decrease in the mitochondrial mass.

*Conclusions.* These results evidence the presence of structural and metabolic differences

between the nasal and temporal regions of the RPE in naive animals, as well as that SCGx has differential effects on these parameters. Moreover, they suggest that the particular structure and metabolism of the macular RPE, rather than the pathophysiology of AMD, might be the factor conditioning the location of the disease.

Sobre a susceptibilidade particular da mácula à degeneração macular associada com idade não exsudativa

*Introdução.* A degeneração macular associada com idade não exsudativa (AMDS) é a causa principal de cegueira em adultos maiores de 50 anos e se caracteriza pela atrofia do epitélio pigmentar da retina (EPR) e fotorreceptores (FR) exclusivamente na mácula. O EPR macular se encontra exposto a um ambiente oxidante associado à demanda metabólica, níveis elevados de espécies reativas de oxigênio e o fluxo coroídeo macular. Tem-se sugerido que o dano oxidativo do EPR macular poderia estar envolvido nos mecanismos patogênicos da AMDS. O fato de apenas a mácula ser afetada pela AMDS, enquanto—pelo menos clinicamente—o resto da retina permanece intacta, ainda em etapas tardias da doença, apresenta a pergunta de porquê a mácula é particularmente susceptível ao dano por AMDS. Os modelos existentes de AMDS não reproduzem as características centrais da doença humana. Recentemente desenvolvemos um modelo AMDS induzido por gangliectomia cervical superior (GCSx) em ratos C57BL/6J, que reproduz as características principais da doença, principalmente a localização dos danos, circunscritos ao EPR/retina neural central temporal.

*Objetivo.* Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi analisar as diferenças regionais no sistema antioxidante endógeno, o status mitocondrial e a estrutura do EPR de animais naive e logo de GCSx que puderam explicar a susceptibilidade localizada frente a AMDS.

*Métodos.* Utilizaram-se ratos C57/BL6 macho adultos naive e logo de 6 semanas pós-GCSx unilateral. Nestes últimos, o lado contralateral foi submetido a um procedimento simulado. Em EPR nasal e temporal se analisaram o conteúdo

de melanina (histología), os níveis de enzimas antioxidantes (*Western blot*) y a massa mitocondrial. Logo de 6 semanas pós-GCSx se avaliou a presença de marcadores de dano oxidativo (4HNE, CML e MitoSOX), os níveis de enzimas antioxidantes e a massa mitocondrial.

**Resultados.** No EPR temporal de animais naive se encontrou menor conteúdo de melanina, dobras basais mais altos, maiores níveis de enzimas antioxidantes e maior massa mitocondrial respeito do EPR nasal. No EPR temporal (mas não nasal) a GCSx induziu uma diminuição significativa nos níveis de enzimas antioxidantes, um incremento em marcadores de dano oxidativo e uma diminuição significativa na massa mitocondrial.

**Conclusões.** Estes resultados demostram a presença de diferenças estruturais e metabólicas entre a região nasal e temporal do EPR de animais naive e efeitos diferenciais da GCSx sobre estes parâmetros. Além disso, sugerem que poderia não ser a fisiopatologia da AMDS senão a estrutura e o metabolismo particular do EPR macular o que condicione a localização da doença.

11

## La melatonina protege el epitelio pigmentario retinal y la retina central en un modelo de degeneración macular asociada con la edad no exudativa en ratón

Diéguez HH<sup>a</sup>, Romeo EH<sup>b</sup>, Alaimo A<sup>c</sup>, González Fleitas MF<sup>a</sup>, Aranda ML<sup>a</sup>, Sande PH<sup>a</sup>, Rosenstein RE<sup>a</sup>, Dorfman D<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratorio de Neuroquímica Retiniana y Oftalmología Experimental, Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina/ CEFyBO, UBA/CONICET, Buenos Aires.

<sup>b</sup>Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias, Pontificia Universidad Católica Argentina (UCA). IBIOMED/UCA/CONICET, Buenos Aires.

<sup>c</sup>Laboratorio Interdisciplinario de Dinámica Celular y Nanoherramientas, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, IQUBICEN, UBA/CONICET, Buenos Aires. her.die.14@gmail.com

**Objetivo.** La degeneración macular asociada con la edad no exudativa (AMDS) es la principal causa de ceguera en personas mayores de 50 años y se caracteriza por la atrofia del epitelio pigmentario retinal (EPR) y fotorreceptores (FR) exclusivamente en la mácula. Actualmente no existen terapias efectivas para prevenir o retrasar la pér-

didada de la visión inducida por AMDS. El EPR macular se encuentra expuesto a un ambiente oxidante asociado con la demanda metabólica, niveles elevados de especies reactivas de oxígeno y el flujo coroideo macular. Se ha sugerido que el daño oxidativo del EPR macular podría estar involucrado en los mecanismos patogénicos de la AMDS. Recientemente desarrollamos un modelo AMDS inducido por gangliectomía cervical superior (GCSx) en ratones C57BL/6J que reproduce las características principales de la enfermedad. Los resultados preliminares demostraron que la GCSx induce estrés oxidativo circunscripto a la región temporal del EPR y la retina neural. La melatonina es una hormona que participa en la regulación de los ritmos circadianos y en varios aspectos del funcionamiento fisiológico, y se ha comprobado su efecto antioxidante y antiinflamatorio en diversos modelos de neurodegeneración. En este contexto, el objetivo de nuestro trabajo fue analizar el efecto de la melatonina sobre las alteraciones inducidas por GCSx.

**Métodos.** Se realizó una GCSx unilateral en ratones C57/BL6 adultos, mientras que en el lado contralateral se hizo un procedimiento simulado. A las 48 horas, una vez constatada la denervación simpática ocular, se implantó un pellet subcutáneo de melatonina que fue repuesto cada dos semanas. A las 4, 6 y 10 semanas pos-GCSx se evaluó la función retinal (electrorretinografía escotópica, ERG) y se analizó el contenido de melanina (histología) y los niveles de RPE65 (inmunohistoquímica) en el EPR. A las 6 semanas pos-GCSx se estudió la presencia de indicadores de daño oxidativo (4HNE, CML y MitoSOX). A las 10 semanas poscirugía se analizó la ultraestructura de la membrana de Bruch (MBr), EPR y FR (por microscopía electrónica). Finalmente, con el objetivo de evaluar la posible reversión de las alteraciones inducidas por GCSx, se implantó el pellet de melatonina a partir a las 4 semanas pos-GCSx y se evaluó la función retinal, el contenido de melanina y la inmunorreactividad para RPE65 a las 10 semanas pos-GCSx.

**Resultados.** La melatonina —que no tuvo efectos *per se* sobre ningún parámetro estudiado— no revirtió las alteraciones coroideas inducidas por GCSx y no tuvo efectos sobre el sector nasal; evitó el daño oxidativo del EPR y la retina neural y pre-

vino las alteraciones mitocondriales temporales luego de 6 semanas pos-GCSx. Además, el tratamiento con melatonina previno significativamente la disfunción retinal, las alteraciones histológicas y ultraestructurales del EPR y la retina neural temporal a las 10 semanas pos-GCSx. Finalmente, la aplicación de melatonina a las 4 semanas pos-GCSx revirtió la disfunción retinal, así como la pérdida del contenido de melanina y la disminución en la inmunorreactividad de RPE65 a las 10 semanas pos-GCSx.

*Conclusiones.* Estos resultados demuestran que la melatonina previno y revirtió las alteraciones en el EPR y retina neural inducidos por AMDS experimental y podría considerarse como una terapia efectiva para el tratamiento de la AMDS.

*Financiación.* Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica [PICT 1623]; Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica [PICT 0356]; UBA [20020100100678]; CONICET [PIP 0446], Argentina.

Melatonin protects the central retinal pigment epithelium and retina in a mice model of non-exudative age-related macular degeneration

*Objective.* Non-exudative age-related macular degeneration (AMD) is the leading cause of blindness in adults over 50 years of age, and it is characterized by retinal pigment epithelium (RPE) and photoreceptor (PR) atrophy exclusively in the macula. Currently there are no effective therapies to prevent or delay AMD-induced visual loss. The macular RPE is exposed to an oxidative environment associated with the metabolic demand, and elevated levels of reactive oxygen species and macular choroidal flow. It has been suggested that macular RPE oxidative damage might be involved in the pathogenic mechanisms of AMD. Recently, we have developed a model of AMD induced by superior cervical gangliectomy (SCGx) in C57BL/6J mice that reproduces the main features of the disease. The preliminary results showed that SCGx induces oxidative stress that is circumscribed to the temporal region of the RPE and neural retina. Melatonin is a hormone involved in the regulation of circadian rhythms and in several aspects of physiologic function, and its antioxidant and

anti-inflammatory effects have been demonstrated in different neurodegeneration models. In this context, the goal of this paper was to analyze the effect of melatonin on SCGx-induced changes.

*Methods.* Adult C57/BL6 mice underwent unilateral SCGx, while a simulated procedure was performed on the contralateral side. Forty-eight hours after the procedure, once ocular sympathetic denervation was verified, a subcutaneous pellet of melatonin was implanted and replaced at 2-week intervals. At weeks 4, 6 and 10 post-SCGx the retinal function was evaluated (scotopic electroretinogram, ERG) and melanin content (histology) and RPE65 levels (immunohistochemistry) of the RPE were analyzed. At 6 weeks post-SCGx, the presence of oxidative damage markers (4HNE, CML and MitoSOX) was analyzed. At 10 weeks postoperatively, the ultrastructures of Bruch's membrane (BrM), RPE and PRs were evaluated by electron microscopy. Finally, with the purpose of evaluating the possible reversion of SCGx-induced changes the melatonin pellet was implanted as from 4 weeks postoperatively and retinal function, melatonin content and RPE65 immunoreactivity were examined at 10 weeks post-SCGx.

*Results.* Melatonin —which had no effects *per se* on any of the parameters studied— failed to revert the choroidal changes induced by SCGx and had no effects on the nasal area; in addition, it prevented RPE and neural retina oxidative stress as well as temporal mitochondrial changes after 6 weeks of surgery. Moreover, melatonin treatment significantly prevented retinal dysfunction, RPE and neural retina histologic and ultrastructural changes at 10 weeks post-SCGx. Finally, melatonin administration at 4 weeks post-SCGx reverted retinal dysfunction as well as melanin content loss and reduced RPE65 immunoreactivity at 10 weeks post-SCGx.

*Conclusions.* These results evidence that melatonin prevented and reverted RPE and neural retinal changes induced by experimental AMD, and that it might be considered as an effective therapy for AMD.

*Funding.* Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica [PICT 1623]; Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica [PICT 0356]; UBA [20020100100678]; CONICET [PIP 0446], Argentina.

A melatonina protege o epitélio pigmentar da retina e a retina central em um modelo de degeneração macular associada com a idade não exsudativa no rato

**Objetivo.** A degeneração macular associada com a idade não exsudativa (AMDS) é a principal causa de cegueira em pessoas maiores de 50 anos e se caracteriza pela atrofia do epitélio pigmentário da retina (EPR) e fotorreceptores (FR) exclusivamente na mácula. Atualmente não existem terapias efetivas para prevenir ou atrasar a perda da visão induzida por AMDS. O EPR macular se encontra exposto a um ambiente oxidante associado com a demanda metabólica, níveis elevados de espécies reativas de oxigênio e o fluxo coroídeo macular. Tem se sugerido que o dano oxidativo do EPR macular poderia estar envolvido nos mecanismos patogênicos da AMDS. Recentemente desenvolvemos um modelo AMDS induzido por gangliectomia cervical superior (GCSx) em ratos C57BL/6J que reproduz as características principais da doença. Os resultados preliminares demonstraram que a GCSx induz estresse oxidativo circunscrito à região temporal do EPR e a retina neural. A melatonina é um hormônio que participa na regulação dos ritmos circadianos e em vários aspectos do funcionamento fisiológico, e tem se comprovado seu efeito antioxidante e anti-inflamatório em diversos modelos de neurodegeneração. Neste contexto, o objetivo de nosso trabalho foi analisar o efeito da melatonina sobre as alterações induzidas por GCSx.

**Métodos.** Realizou-se uma GCSx unilateral em ratos C57/BL6 adultos, enquanto no lado contralateral se realizou um procedimento simulado. Às 48 horas, uma vez constatada a denervação simpática ocular, um pellet subcutâneo de melatonina foi implantado e foi substituído cada duas semanas. Às 4, 6 e 10 semanas pós-GCSx se avaliou a função da retina (eletrorretinografia escotópica, ERG) e se analisou o conteúdo de melanina (histologia) e os níveis de RPE65 (imunohistoquímica) no EPR. Às 6 semanas pós-GCSx se estudou a presença de indicadores de dano oxidativo (4HNE, CML e MitoSOX). Às 10 semanas pós-cirurgia se analisou a ultraestrutura da membrana de Bruch (MBr), EPR e FR (por microscopia eletrônica). Finalmente, com o objetivo de avaliar a possível

reversão das alterações induzidas por GCSx, o pellet de melatonina foi implantado a partir das 4 semanas pós-GCSx e se avaliou a função da retina, o conteúdo de melanina e a imunorreatividade para RPE65 às 10 semanas pós-GCSx.

**Resultados.** A melatonina —que não teve efeitos *per se* sobre nenhum parâmetro estudado— não reverteu as alterações coroídeas induzidas por GCSx e não teve efeitos sobre o sector nasal; evitou o dano oxidativo do EPR e a retina neural e previno as alterações mitocondriais temporais logo de 6 semanas pós-GCSx. Além disso, o tratamento com melatonina preveniu significativamente a disfunção da retina, as alterações histológicas e ultra estruturais do EPR e a retina neural temporal às 10 semanas pós-GCSx. Finalmente, a aplicação de melatonina às 4 semanas pós-GCSx reverteu a disfunção da retina, bem como, a perda do conteúdo de melanina e a diminuição na imunorreatividade de RPE65 às 10 semanas pós-GCSx.

**Conclusões.** Estes resultados demonstram que a melatonina preveniu e reverteu as alterações no EPR e retina neural induzidos por AMDS experimental e poderia considerar-se como uma terapia efetiva para o tratamento da AMDS.

**Financiamento.** Agencia Nacional de Promoção Científica e Tecnológica [PICT 1623]; Agencia Nacional de Promoção Científica e Tecnológica [PICT 0356]; UBA [20020100100678]; CONICET [PIP 0446], Argentina.

---

12

---

## La cianotoxina $\beta$ -n-methylamino-L-alanine (BMAA) induce daños neurodegenerativos en neuronas y células gliales de retina

Soto, Tamara; De los Santos, Beatriz; Rotstein, Nora; German, Lorena; Politi, Luis.

*Instituto de Investigaciones Bioquímicas (INIBIBB); Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional del Sur (UNS)-CONICET, Bahía Blanca, Argentina.*  
 tbsoto@inibibb-conicet.gob.ar

**Objetivos.** La cianotoxina  $\beta$ -n-metilamino-L-alanina (BMAA) es un aminoácido no proteico involucrado en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas, como la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y las enfermedades de Parkinson y Alzheimer. Los estudios previos han

reportado efectos tóxicos de la BMAA en animales. Sus mecanismos de acción a nivel celular y molecular son aún desconocidos. En este trabajo analizamos los efectos de la BMAA sobre neuronas de retina y células gliales de Müller *in vitro*.

**Métodos.** Se utilizaron cultivos neuronales puros y cultivos mixtos neurogliales de retinas de ratas recién nacidas. Los cultivos se incubaron con BMAA (400 nM) y al cabo de 3 o 5 días se evaluó la supervivencia y la integridad nuclear con las sondas Ioduro de propidio y DAPI, respectivamente. La preservación del potencial de membrana mitocondrial se evaluó con Mitotracker; la integridad del citoesqueleto y el crecimiento axonal se evaluaron por técnicas inmunocitoquímicas con faloidina y con un anticuerpo anti- $\beta$  tubulina.

**Resultados.** La BMAA aumentó significativamente la muerte celular y la apoptosis en las neuronas: de 10% a 33% y de 28% a 50%, respectivamente, un efecto que se correspondió con un descenso del potencial de membrana mitocondrial de 77% a 50%. Además, cerca del 40% de las neuronas mostraron desorganización de la tubulina en los extremos axonales. En cultivos mixtos neurogliales la BMAA indujo un aumento en la longitud de los axones que fue bloqueado por LY294002, un inhibidor de la PI3-quinasa. La BMAA disminuyó el potencial de membrana mitocondrial en las células gliales, aunque no provocó la muerte celular hasta los 13 días de cultivo, cuando mostraron un aumento en su fragmentación nuclear. Las células gliales en cocultivo no protegieron a las neuronas de la apoptosis inducida por BMAA.

**Conclusiones.** Estos resultados sugieren que la BMAA afecta la viabilidad neuronal, causando apoptosis, y que las células gliales no son capaces de prevenir esta muerte, pese a incrementar el desarrollo axonal como respuesta inicial al daño. Las células gliales serían más resistentes a este daño, aunque presentan alteraciones mitocondriales que conducirían a su degeneración a tiempos tardíos. Los daños observados podrían estar en la base de las enfermedades neurodegenerativas relacionadas con la BMAA.

**Subsidios.** PGI 24/B235, y Proyecto 5682, Universidad Nacional del Sur; ANPCYT: PICT 2016-0353; y CONICET: PIP 1122015.

Cyanotoxin  $\beta$ -n-methylamino-l-alanine (BMAA) induces neurodegenerative damage in retinal neurons and glial cells

**Objectives.** Cyanotoxin  $\beta$ -n-methylamino-l-alanine (BMAA) is a non-protein aminoacid involved in the development of neurodegenerative diseases, such as amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and Parkinson's and Alzheimer's diseases. Previous studies have reported toxic effects of BMAA in animals. However, its mechanisms of action at both cellular and molecular levels remain still unknown. In this paper we analyze the effects of BMAA on retinal neurons and Müller glial cells *in vitro*.

**Methods.** Pure neuronal cultures and mixed neuroglial cultures of newborn rat retinas were used. Cultures were incubated with BMAA (400 nM) and after 3 or 5 days, survival and nuclear integrity were evaluated by propidium iodide and DAPI probes, respectively. Mitochondrial membrane potential preservation was evaluated with MitoTracker; the integrity of the cytoskeleton and axonal growth were examined by immunocytochemistry techniques with phalloidin and with an anti- $\beta$ -tubulin antibody.

**Results.** BMAA significantly increased cell death and apoptosis in neurons: from 10% to 33% and from 28% to 50%, respectively, an effect that was associated with a decrease in the mitochondrial membrane potential from 77% to 50%. In addition, near 40% of neurons evidenced disorganization of tubulin at the axonal ends. In neuroglial mixed cultures, BMAA induced an increase in axon length that was blocked by LY294002, a PI3-kinase. BMAA reduced the mitochondrial membrane potential of glial cells, though cell death did not occur until 13 days of culture, when there was an increase in nuclear fragmentation. Glial cell co-cultures failed to protect neurons from BMAA-induced apoptosis.

**Conclusions.** These results suggest that BMAA affects neuronal viability by causing apoptosis, and that glial cells are not capable of preventing this death though there is increased axonal development as an initial response to damage. Glial cells may be more resistant to this damage, though they have mitochondrial changes, possibly leading to their degeneration at later stages. The damage



observed might lie in the basis of neurodegenerative diseases related to BMAA.

*Grants.* PGI 24/B235, and Project 5682, Universidad Nacional del Sur; ANPCYT: PICT 2016-0353; and CONICET: PIP 1122015.

A cianotoxina  $\beta$ -n-methylamino-L-alanine (BMAA) induz danos neurodegenerativos em neurônios e células gliais de retina

*Objetivos.* A cianotoxina  $\beta$ -n-metilamino-L-alanina (BMAA) é um aminoácido não proteico envolvido no desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, como a esclerose lateral amiotrófica (ELA) e as doenças de Parkinson e Alzheimer. Os estudos prévios têm reportado efeitos tóxicos da BMAA em animais. Seus mecanismos de ação no nível celular e molecular são ainda desconhecidos. Neste trabalho analisamos os efeitos da BMAA sobre neurônios de retina e células gliais de Müller in vitro.

*Métodos.* Utilizaram-se culturas neuronais puras e culturas mistas neurogliais de retinas de ratos recém-nascidas. As culturas foram incubadas com BMAA (400 nM) e logo de 3 ou 5 dias se avaliou a supervivência e a integridade nuclear com as sondas iodeto de propídio e DAPI, respectivamente. A preservação do potencial de membrana mitocondrial se avaliou com Mitotracker; a integridade do citoesqueleto e o crescimento axônico foram avaliados por técnicas imunocitoquímicas com faloidina e com um anticorpo anti- $\beta$  tubulina.

*Resultados.* A BMAA acrescentou significativamente a morte celular e a apoptose nos neurônios: de 10% a 33% e de 28% a 50%, respectivamente, m efeito que se correspondeu com um descenso do potencial de membrana mitocondrial de 77% a 50%. Além disso, aproximadamente 40% dos neurônios mostraram desorganização da tubulina nos extremos dos axônios. Em culturas mistas neurogliais, a BMAA induziu um crescimento na amplitude dos axônios que foi bloqueado por LY294002, um inibidor da PI3-quinase. A BMAA diminuiu o potencial de membrana mitocondrial nas células gliais, embora não provocou a morte celular até os 13 dias de cultura, quando mostraram um aumento em sua fragmentação nuclear.

As células gliais em cocultura não protegeram os neurônios do apoptose induzido por BMAA.

*Conclusões.* Estes resultados sugerem que a BMAA afeta a viabilidade neuronal, causando apoptose, e que as células gliais não são capazes de prevenir essa morte, apesar de aumentar o desenvolvimento axônico como resposta inicial ao dano. As células gliais seriam mais resistentes a este dano, embora apresentem alterações mitocondriais que conduziriam a sua degeneração a tempos tardios. Os danos observados poderiam estar na base das doenças neurodegenerativas relacionadas com a BMAA.

*Subsidios.* PGI 24/B235, e Projeto 5682, Universidade Nacional do Sur; ANPCYT: PICT 2016-0353; e CONICET: PIP 1122015.

---

13

---

### Telemedicina *smartphone* y prevención de ceguera: retinografías con prototipo ODI-HF (oftalmoscopia digital indirecta manos libres): proyecto de biometria y reconstrucción de imágenes por inteligencia artificial

Saidman, Gabriela<sup>a</sup>; Monteoliva, Guillermo<sup>a,d</sup>; Urrets Zavalía, Julio<sup>b</sup>; Salvatelli, Adrián<sup>c</sup>; Ortiz Basso, Tomás<sup>d</sup>; Giusio, Fernando<sup>d</sup>; Torres, Rodrigo M.<sup>e</sup>

<sup>a</sup> Red ROP Zona Sur Buenos Aires, Hospital Evita Pueblo Berazategui (Base de Red Región VI); HIGA San Martín La Plata (Base de Red Región XI), Departamento de Oftalmología, Argentina.

<sup>b</sup> Clínica Universitaria "Reina Fabiola", Universidad Nacional de Córdoba, Argentina

<sup>c</sup> Laboratorio de Sistemas de Información, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Entre Ríos, Oro Verde, Argentina

<sup>d</sup> Sección Telemedicina, Departamento de Oftalmología, Hospital Italiano de Buenos Aires.

<sup>e</sup> Centro de Ojos Dr. Lódolo, Paraná, Entre Ríos, Argentina. gabysaidman@hotmail.com

*Objetivos.* Comunicar el desarrollo de un sistema de registro de retinografías *smartphone* con técnica de manos libres (*hands-free*) logrando imágenes de alta calidad con costo/eficiencia. Además, presentar el proyecto de biometría y reconstrucción de imágenes mediante inteligencia artificial (AI) para redes de telemedicina y prevención de ceguera.

*Material y método.* El prototipo actual presenta un brazo ajustable para regular la distancia de trabajo con diferentes pacientes y lupas aplicado a un casco de oftalmoscopia indirecto

en un extremo y un soporte con imanes en el otro, para sostener el *smartphone* y permitir al observador ver por la pantalla durante el examen. Se filma en modo UHD/4K y se realiza el examen con la misma técnica que en la oftalmoscopia binocular indirecta (OBI), colocando el *smartphone* en modo video con luz led de flash continuo, con zoom ajustado al 50%, según el tipo de lupa utilizada (20D, 30D, 28D, 40D, súper 66D).

**Resultados.** Esta técnica con manos libres permite alcanzar la periferia retinal, muy útil en el examen de ROP y otras patologías, y prescinde de colaboradores para el registro. Además, permite rotar el globo ocular y lograr filmaciones e imágenes por cuadrantes, reconstruyendo imágenes con mejora angular. Además, el dispositivo impide el contacto directo con las manos del observador una vez seteado el teléfono, lo cual mejora la seguridad del paciente.

**Conclusiones.** Aunque la fundoscopia *smartphone* puede realizarse con varias técnicas y dispositivos, este prototipo casco manos libres ha demostrado ser simple y fácil de utilizar, a bajo costo, lo que lo posiciona como una útil herramienta para futuros proyectos de telemedicina *smartphone* y prevención de ceguera, tanto en ROP como en otras patologías de la oftalmología, a la vez que capacita a oftalmólogos en formación. La técnica permite lograr imágenes de calidad, que están siendo estudiadas mediante IA para mejorar la seguridad de las redes y del paciente (ID de estudio de paciente), reconocimiento por IA de nervio óptico (biometría) y reconstrucción automática de imágenes por AI.

Smartphone telemedicine and prevention of blindness: MIO-HF (hands-free mobile indirect ophthalmoscopy) prototype retinography. AI (artificial intelligence) biometry and image reconstruction

**Objectives.** To describe the development of a system recording smartphone retinographies with the hands-free technique by which high-quality and cost-efficient images are acquired. In addition, we describe our artificial

intelligence (AI) biometry and images reconstruction project for telemedicine networks and prevention of blindness.

**Material and method.** The current prototype has an adjustable arm to regulate the working distance according to each individual patient and has magnifying glasses mounted on an indirect ophthalmoscopy helmet on one end, and a holder with magnets on the other to hold the smartphone for the observer to watch on a screen during examination. The examination is filmed using the UHD/4K mode and performed with the same technique as indirect binocular ophthalmoscopy (OBI), with a smartphone in video mode, a continuous flash led light and the zoom adjusted to 50%, according to the magnifying glass used (20D, 30D, 28D, 40D, super 66D).

**Results.** With this hands-free technique, the retinal periphery can be reached out. This is very useful when examining ROP and other diseases since no assistants are needed for records. Moreover, the eyeball can be rotated for video and image acquisition by quadrants and improved angle image reconstruction. Furthermore, the device prevents the observer's hands from having direct contact once the phone has been set, thereby providing better safety for the patient.

**Conclusions.** Though there are many techniques and devices that can be used for smartphone funduscopy, this hands-free prototype helmet has evidenced to be simple, easy-to-use and low-cost, thus positioning it as a useful tool for future smartphone telemedicine and blindness prevention programs, both in ROP and other ophthalmologic diseases, and also for ophthalmologists in training to learn. The technique provides high-quality images that are being studied by AI to improve network and patient safety (ID of the patient's test), AI optic nerve identification (biometry) and AI image automatic reconstruction.

Telemedicina *smartphone* e prevenção de cegueira: retinografias com protótipo ODI-HF (oftalmoscopia digital indireta mãos livres): projeto de biometria e reconstrução de imagens por inteligência artificial

**Objetivos.** Comunicar o desenvolvimento de um sistema de registro de retinografias *smartphone* com técnica de mãos livres (*hands-free*) conseguindo imagens de alta qualidade com custo/eficiência. Além disso, apresentar o projeto de biometria e reconstrução de imagens através de inteligência artificial (AI) para redes de telemedicina e prevenção de cegueira.

**Material e método.** O protótipo atual apresenta um braço ajustável para regular a distância de trabalho, com diferentes pacientes e lupas, aplicado a um capacete de oftalmoscópio indireto em um extremo e um suporte com imãs no outro, para sustentar o *smartphone* e permitir ao observador ver pela tela durante o exame. Filma-se em modo UHD/4K e se realiza o exame com a mesma técnica que na oftalmoscopia binocular indireta (OBI), colocando o *smartphone* em modo vídeo com luz led de flash contínuo, com zoom ajustado ao 50%, segundo o tipo de lupa utilizada (20D, 30D, 28D, 40D, super 66D).

**Resultados.** Esta técnica com mãos livres permite alcançar a periferia da retina, muito útil no exame de ROP e outras patologias, e prescinde de colaboradores para o registro. Também permite girar o globo ocular e conseguir filiações e imagens por quadrantes, reconstruindo imagens com melhora angular. Além disso, o dispositivo impede o contato direto com as mãos do observador uma vez configurado o telefone, o qual melhora a segurança do paciente.

**Conclusões.** Embora a fundoscopia *smartphone* possa realizar-se com várias técnicas e dispositivos, este protótipo capacete mãos livres têm demonstrado ser fácil e simples de utilizar, a baixo custo, o que o coloca como uma ferramenta útil para futuros projetos de telemedicina *smartphone* e prevenção de cegueira, tanto em ROP quanto em outras patologias da oftalmologia, ao mesmo tempo que capacita a oftalmologistas em formação. A técnica permite conseguir imagens de qualidade, que estão sendo estudadas por meio de IA para melhorar a segurança das redes e do paciente (ID de estudo de paciente), reconhecimento por IA de nervo óptico (biometria) e reconstrução automática de imagens por AI.

## Efecto de NO<sub>2</sub>-OA sobre el estrés oxidativo y la reactividad glial en células gliales de Müller

Vaglianti, María V.; Ridano, Magali E.; Subirada, Paula V.; Paz, María C.; Barcelona, Pablo F.; Bonacci, Gustavo R.; Sánchez, María C.

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

Las retinopatías proliferativas se encuentran entre las principales causas de ceguera irreversible. La patogénesis de la retinopatía diabética es multifacética, incluyendo cambios proinflamatorios, estrés oxidativo y nitrosativo, entre otros. Los cambios metabólicos generados durante la diabetes alteran la barrera hematorretinal, lo que permite la extravasación de proteínas plasmáticas como  $\alpha_2$ -macroglobulina ( $\alpha_2$ M), la cual es un inhibidor de proteinasas con capacidad de unir factores de crecimiento y citoquinas en el espacio extracelular. Trabajos previos de nuestro grupo demostraron que  $\alpha_2$ M induce incremento en los niveles proteicos de GFAP en células gliales de Müller (CGM). En los últimos años se demostró que los ácidos grasos-nitrados (NO<sub>2</sub>-FA) tienen propiedades antiinflamatorias y citoprotectoras, mediadas por la activación de la vía antioxidante Keap1-Nrf2, entre otras. Estos antecedentes los convierte en moléculas de interés farmacológico asociadas con procesos isquémicos e inflamatorios como las retinopatías. Recientemente demostramos que el tratamiento con ácido oleico nitrado (NO<sub>2</sub>-OA) induce la activación del factor de transcripción Nrf2 en la línea de CGM humana inmortalizada (MIO-M1) a través del aumento en la expresión de genes tales como hemoxygenasa 1 (HO-1). Al considerar estos hallazgos, planteamos la hipótesis de que los NO<sub>2</sub>-FA pueden modular la respuesta antioxidante y citoprotectora en retinopatías neovasculares. Para ello, se preincubaron células MIO-M1 con NO<sub>2</sub>-OA y luego estimuladas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50-200  $\mu$ mol/l) durante una hora. Los resultados mostraron que NO<sub>2</sub>-OA redujo el daño provocado por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Posteriormente, con el propósito de analizar si el pretratamiento con NO<sub>2</sub>-OA era capaz de prevenir la reactividad glial, células MIO-M1 se preincubaron con NO<sub>2</sub>-OA por 30 minutos y luego estimuladas con  $\alpha_2$ M por 2, 4

y 6 horas. Los resultados demostraron que el pretratamiento con NO<sub>2</sub>-OA antes de las 6 horas de estímulo redujo los niveles de GFAP a niveles del control. En base a estos resultados, podemos concluir que el NO<sub>2</sub>-OA puede actuar como un antioxidante protegiendo a las células retinales del daño provocado por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> así como del estrés glial producido por α<sub>2</sub>M.

Effect of NO<sub>2</sub>-OA on oxidative stress and glial reactivity in Müller glial cells

Proliferative retinopathies are among the main causes of irreversible blindness. The pathogenesis of diabetic retinopathy is multipronged, including proinflammatory changes and oxidative and nitrosative stress, among others. Metabolic changes generated during diabetes have an impact on the blood-retinal barrier, allowing for extravasation of plasma proteins such as α<sub>2</sub>-macroglobulin (α<sub>2</sub>M), a proteinase inhibitor with the capacity to bind growth factors and cytokines in the extracellular space. Previous reports by our group have demonstrated that α<sub>2</sub>M induces an increase in GFAP protein levels in Müller glial cells (MGC). In recent years, it has been evidenced that nitrofatty acids (NO<sub>2</sub>-FA) have anti-inflammatory and cytoprotective properties mediated by the Keap1-Nrf2 antioxidant pathway activation, among others. Due to this background they have become molecules of pharmacologic interest associated with ischemic and inflammatory processes, such as retinopathies. We have recently demonstrated that treatment with nitro-oleic acid (NO<sub>2</sub>-OA) induces the activation of the Nrf2 transcription factor in the immortalized human MGC line (MIO-M1) via an increase in the expression of genes such as heme oxygenase-1 (HO-1). Upon considering these findings, we hypothesized that NO<sub>2</sub>-OA may modulate antioxidant and cytoprotective responses in neovascular retinopathies. For this purpose, MIO-M1 cells were incubated with NO<sub>2</sub>-OA and they were later stimulated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50-200 μmol/l) for an hour. Results obtained demonstrated that NO<sub>2</sub>-OA reduced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced damage. Subsequently, in order to analyze whether

NO<sub>2</sub>-OA pretreatment was able to prevent glial reactivity, MIO-M1 cells were preincubated with NO<sub>2</sub>-OA for 30 minutes and then stimulated with α<sub>2</sub>M for 2, 4 and 6 hours. Results evidenced that pretreatment with NO<sub>2</sub>-OA before 6-hour stimulation reduced GFAP levels to control levels. Based on these results, we can conclude that the action of NO<sub>2</sub>-OA can be the same as that of an antioxidant, by protecting retinal cells from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced damage as well as from α<sub>2</sub>M-induced glial stress.

Efeito de NO<sub>2</sub>-OA sobre o estresse oxidativo e a reatividade glial em células gliais de Müller

As retinopatias proliferativas se encontram entre as principais causas de cegueira irreversível. A patogênese da retinopatia diabética é multifacetada, incluindo mudanças pró-inflamatórias, estresse oxidativo e nitrosativo, entre outros. As mudanças metabólicas geradas durante a diabetes alteram a barreira hematorretiniana, o que permite a extravasação de proteínas plasmáticas como α<sub>2</sub>-macroglobulina (α<sub>2</sub>M) que atua como inibidor de proteinases com capacidade de unir fatores de crescimento e citocinas no espaço extracelular. Trabalhos prévios de nosso grupo têm demonstrado que α<sub>2</sub>M induz incremento nos níveis proteicos de GFAP em células gliais de Müller (CGM). Nos últimos anos se demonstrou que os ácidos graxos-nitrados (NO<sub>2</sub>-FA) tem propriedades anti-inflamatórias e citoprotetoras, mediadas pela ativação da via antioxidante Keap1-Nrf2, entre outras. Estes antecedentes os converte em moléculas de interesse farmacológico associadas com processos isquêmicos e inflamatórios como as retinopatias. Recentemente demonstramos que o tratamento com ácido oléico nitrado (NO<sub>2</sub>-OA) induz a ativação do fator de transcrição Nrf2 na linha de CGM humana imortalizada (MIO-M1) através do aumento na expressão de genes como a hemooxigenasa 1 (HO-1). Ao considerar estes achados, apresentamos a hipótese de que os NO<sub>2</sub>-FA podem modular a resposta antioxidante e citoprotetora em retinopatias neovasculares. Para isso, se pré-incubaram células MIO-M1 com NO<sub>2</sub>-OA e logo estimuladas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

(50-200  $\mu\text{mol/l}$ ) durante una hora. Os resultados mostraram que  $\text{NO}_2\text{-OA}$  reduziu o dano provocado pelo  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Posteriormente, com o propósito de analisar si o pré-tratamiento com  $\text{NO}_2\text{-OA}$  era capazes de prevenir a reatividade glial, células MIO-M1 se pré-incubaram com  $\text{NO}_2\text{-OA}$  por 30 minutos e logo estimuladas com  $\alpha_2\text{M}$  por 2, 4 e 6 horas. Os resultados demostraram que o pré-tratamiento com  $\text{NO}_2\text{-OA}$  antes das 6 horas de estímulo reduziu os níveis de GFAP a níveis do controle. Com base nestes resultados, podemos concluir que o  $\text{NO}_2\text{-OA}$  pode atuar como um antioxidante protegendo às células da retina do dano provocado pelo  $\text{H}_2\text{O}_2$  assim como do estresse glial produzido por  $\alpha_2\text{M}$ .

15

### El factor de crecimiento derivado del epitelio (PEDF) y sus fragmentos neurotróficos promueven la supervivencia y la diferenciación de neuronas de retina

Michelis, Germán<sup>a,b</sup>; German, Lorena<sup>b</sup>; Rotstein, Nora P.<sup>b</sup>; Politi, Luis<sup>b</sup>; Becerra, Patricia<sup>a</sup>

<sup>a</sup> National Eye Institute, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA.

<sup>b</sup> Instituto de Investigaciones Bioquímicas (INIBIBB), Universidad Nacional del Sur-CONICET, Bahía Blanca, Argentina.

**Objetivos.** El factor derivado del epitelio pigmentado (PEDF) protege a células progenitoras de retina. Este factor y pequeños fragmentos pépticos derivados de su región neurotrófica interactúan estimulando la actividad fosfolipásica del tipo A2 de su receptor PEDF-R. Analizamos ahora los efectos del PEDF y sus fragmentos neurotróficos sobre la supervivencia y diferenciación de los fotorreceptores (FR).

**Métodos.** Cultivos puros de FR y neuronas amacrinas de retinas de ratas PN1 se incubaron a día 2 (DIV2) con PEDF o sus fragmentos neurotróficos 17-mer y 44-mer, o antiangiogénico 34-mer (10 nM); y/o en combinación con el péptido bloqueante P1 (100 nM) o el inhibidor selectivo de PEDF-R, Atglistatin, o vehículo (control). A DIV5 evaluamos la muerte celular por técnicas de TUNEL, yoduro de propidio y annexina V, la funcionalidad mitocondrial con la sonda Mitotracker y el desarrollo de neuritis

y expresión de opsina por inmunocitoquímica. Determinamos la presencia del PEDF-R por citoquímica y *Western blot* y analizamos los cambios en el perfil de mRNA por medio del RT2 Profiler Array.

**Resultados.** Las neuronas expresaron y produjeron el PEDF-R con una distribución en la membrana celular. El PEDF redujo la apoptosis de los FR, preservando el potencial de membrana mitocondrial. La citometría de flujo evidenció dos poblaciones: una de ellas marcada con Annexina V, la cual fue rescatada con PEDF. En los cultivos control, la opsina se distribuyó difusamente en las membranas celulares, mientras que el PEDF promovió su localización en los procesos apicales de los FR. El PEDF aumentó la longitud axonal en FR y amacrinas. Las preincubaciones con P1 o atglistatin abolieron estos efectos. Los péptidos 17-mer y 44-mer mimetizaron los efectos del PEDF sobre la supervivencia y expresión de opsina, mientras que el 34-mer no tuvo efecto. El PEDF modificó los patrones de expresión de mRNA con los mayores aumentos a nivel del eje TRAF2-NF $\kappa$ B-Bcl2a1, junto con otros como Grb2, Akt1 y los genes involucrados en autofagia ATG5/12.

**Conclusiones.** Estos resultados muestran que el PEDF activa mecanismos de supervivencia en los FR y promueve la diferenciación tanto en los FR como en las neuronas amacrinas. Indican también que los fragmentos neurotróficos del PEDF son capaces de activar la supervivencia y la diferenciación en los FR que involucraría al mismo sitio activo del PEDF-R.

**Subsidios.** Universidad Nacional del Sur; ANPCYT; CONICET y el Programa de Investigación Intramural del Instituto Nacional del Ojo, National Institutes of Health (NIH).

Pigment epithelium-derived factor (PEDF) and its neurotrophic fragments promote survival and differentiation in retinal photoreceptors

**Objectives.** The pigment epithelium-derived factor (PEDF) protects retinal progenitor cells. This factor and small peptide fragments derived from its neurotrophic region interact by stimu-

lating the phospholipase A2 activity of its receptor (PEDF-R). Here we analyze the effects of PEDF and its neurotrophic fragments on photoreceptor (PR) survival and differentiation.

**Methods.** Pure cultures of PR and amacrine neurons of PN1 rat retinas were incubated on day 2 (DIV2) with PEDF or its neurotrophic fragments 17-mer and 44-mer, or angiogenic 34-mer fragment (10 nM), and/or in combination with P1 blocking peptide (100 nM) or the PEDF-R selective inhibitor Atglistatin or vehicle (control). On DIV5 we evaluated cell death using the following techniques: TUNEL, propidium iodide, annexin V, mitochondrial function with a MitoTracker probe and neurite development and opsin expression by immunocytochemistry. We established the presence of the PEDF-R by cytochemistry and Western blot, and analyzed changes in the mRNA profile by the RT2 Profiler Array.

**Results.** Neurons expressed and produced the PEDF-R with a distribution at the cell membrane. PEDF reduced PR apoptosis, with preservation of mitochondrial membrane potential. Flow cytometry evidenced the presence of two populations: one of them stained with Annexin V, which was rescued with PEDF. In control cultures, opsin was distributed sparsely in cell membranes, while PEDF promoted its localization in the apical processes of PRs. PEDF increased axon length in PRs and amacrine, but preincubations with P1 or atglistatin abolished these effects. Peptides 17-mer and 44-mer mimicked the effects of PEDF on opsin survival and expression, while 34-mer had no effect. PEDF modified mRNA expression profiles, with the greatest increases found at the level of the TRAF2-NF $\kappa$ B-Bcl2a1 axis, together with others, such as Grb2, Akt1 and genes involved in ATG5/12 autophagy.

**Conclusions.** These results show that PEDF activates PR survival mechanisms and promotes differentiation both of PRs and amacrine neurons. They are also indicative of the fact that PEDF neurotrophic fragments are able to activate PR survival and differentiation mechanisms that are believed to involve the same active site as that of the PEDF-R.

**Grants.** Universidad Nacional del Sur; ANPCYT; CONICET and Eye National Institute, National Institutes of Health (NIH) Intramural Research Program.

O fator de crescimento derivado do epitélio (PEDF) e seus fragmentos neurotróficos promovem a supervivência e a diferenciação de neurônios de retina

**Objetivos.** O fator derivado do epitélio pigmentado (PEDF) protege às células progenitoras de retina. Este fator e pequenos fragmentos pépticos derivados de sua região neurotrófica interatuam estimulando a atividade fosfolipásica do tipo A2 de seu receptor PEDF-R. Analisamos agora os efeitos do PEDF e seus fragmentos neurotróficos sobre a supervivência e diferenciação dos fotorreceptores (FR).

**Métodos.** Culturas puras de FR e neurônios amácrinos de retinas de ratos PN1 se incubaram a dia 2 (DIV2) com PEDF ou seus fragmentos neurotróficos 17-mer e 44-mer, ou antiangiogênicos 34-mer (10 nM); e/ou em combinação com o péptido bloqueador P1 (100 nM) ou o inibidor seletivo de PEDF-R, Atglistatin ou veículo (controle). A DIV5 avaliamos a morte celular por técnicas de TUNEL, iodeto de propídio e anexina V, a funcionalidade mitocondrial com a sonda Mitotracker e o desenvolvimento de neurites e expressão de opsina por imunocitoquímica. Determinamos a presença do PEDF-R por citoquímica e *Western blot* e analisamos as mudanças no perfil de mRNA por meio do RT2 Profiler Array.

**Resultados.** Os neurônios expressaram e produziram o PEDF-R com uma distribuição na membrana celular. O PEDF reduziu a apoptose dos FR, preservando o potencial de membrana mitocondrial. A citometria de fluxo evidenciou duas populações: uma delas marcada com Annexina V, que foi resgatada com PEDF. Nas culturas controle, a opsina foi distribuída difusamente nas membranas celulares, enquanto o PEDF promoveu sua localização nos processos apicais dos FR. O PEDF acrescentou a amplitude dos axônios em FR e amácrinos. As pré-incubações com P1 ou atglistatin aboliram estes efeitos. Os péptidos 17-mer e 44-mer mimeti-

zaram os efeitos do PEDF sobre a supervivência e expressão de opsina, enquanto o 34-mer não teve efeito. O PEDF alterou os padrões de expressão de mRNA com os maiores aumentos no nível do eixo TRAF2-NFκB-Bcl2a1, junto com outros como Grb2, Akt1 e os genes envolvidos na autofagia ATG5/12.

**Conclusões.** Estes resultados mostram que o PEDF ativa mecanismos de supervivência nos FR e promove a diferenciação tanto nos FR quanto nos neurônios amácrinos. Indicam também que os fragmentos neurotróficos do PEDF são capazes de ativar a supervivência e a diferenciação nos FR que envolveria ao mesmo sítio ativo do PEDF-R.

**Subsídios.** Universidade Nacional do Sur; ANPCYT; CONICET e o Programa de Investigación Intramural do Instituto Nacional do Olho, National Institutes of Health (NIH).

---

16

---

## Exposición a un ambiente enriquecido como estrategia terapéutica en un modelo de glaucoma experimental

González Fleitas F, Devouassoux J, Aranda M, Chianelli M, Keller Sarmiento I, Diéguez H, Sande P, Dorfman D, Rosenstein R.

Laboratorio de Neuroquímica Retiniana y Oftalmología Experimental, Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, CEFyBO-CONICET. florgf88@gmail.com

**Objetivos.** El glaucoma, una de las principales causas de ceguera, involucra la muerte de las células ganglionares retinales (CGR) y la pérdida de axones del nervio óptico (NO). El principal factor de riesgo para el desarrollo de la neuropatía óptica glaucomatosa es el aumento crónico de la presión intraocular (PIO). Sin embargo, en un porcentaje de pacientes con control efectivo de la PIO, la progresión de las alteraciones visuales persiste. En este trabajo analizamos el efecto de la exposición a un ambiente enriquecido (AE) sobre las alteraciones retinales y del NO en un modelo de glaucoma experimental inducido por inyecciones de condroitín sulfato (CS).

**Métodos.** Se inyectaron semanalmente ratas *Wistar* macho adultas con vehículo o CS en

cámara anterior y se albergaron en ambiente estándar (AS) o AE durante 10 semanas. Se registraron los potenciales oscilatorios (PO) por electroretinografía y los potenciales visuales evocados (PVE) mediante electrodos en corteza visual primaria a las 10 semanas de tratamiento. Además, analizó el número de CGR (inmunoreactividad para Brn3a), el número de axones en el NO por azul de toluidina y marcadores axogliales en retina y NO (microglía/macrófagos: Iba-1; axones: neurofilamento fosforilado [pNFH]; mielina: proteína básica de la mielina [MBP]) por inmunohistoquímica. A las 6 semanas de tratamiento se analizaron los niveles de BDNF como posible mecanismo de protección temprana del AE.

**Resultados.** La administración de CS provocó un aumento sostenido de la PIO que no se modificó por la exposición a AS o AE. A las 10 semanas de tratamiento, en los ojos inyectados con CS de los animales albergados en AS, se evidenció una reducción en las amplitudes de los PO y de los PVE, así como una disminución en el número de CGR y de axones. La hipertensión ocular crónica indujo un aumento del área Iba(+) en la retina a las 10 semanas. En la región proximal del NO, la administración de CS produjo un incremento en el área Iba1(+), una reducción en el área pNFH(+), así como signos de desmielinización evidenciados por una disminución en el área MBP(+). Estas alteraciones fueron prevenidas por la exposición al AE. A las 6 semanas de tratamiento, se observó un aumento en los niveles de BDNF en retinas de los ojos inyectados con CS de los animales albergados en AE.

**Conclusión.** Estos resultados sugieren que la exposición a un AE podría prevenir las alteraciones glaucomatosas en la retina y el NO por un mecanismo dependiente de BDNF.

Exposure to an enriched environment as a therapeutic strategy in an experimental glaucoma model

**Objectives.** Glaucoma, one of the leading causes of blindness, involves the death of retinal ganglion cells (RGCs) and optic nerve (ON) axon loss. The main risk factor for the

development of glaucomatous optic neuropathy is chronic intraocular pressure (IOP) rises. However, in a rate of patients with effective IOP control, progression of visual impairment persists. In this paper we analyze the effect of exposure to an enriched environment (EE) on retinal and ON changes in an experimental model of glaucoma induced by chondroitin sulfate (CS) injections.

*Methods.* Adult male Wistar rats received weekly injections of vehicle or CS in the anterior chamber and were kept in a standard environment (SE) or an EE for 10 weeks. Ten weeks after treatment, oscillatory potentials (OP) were recorded by electroretinogram and visual evoked potentials (VEP), by electrodes implanted in the primary visual cortex. Likewise, we analyzed the number of RGC (Brn3a-immunoreactivity), number of ON axons by toluidine blue and axoglial markers in the retina and ON (microglia/macrophages: Iba-1; axons: phosphorylated neurofilament [pNFH]; myelin: myelin basic protein [MBP]) by immunohistochemistry. At week 6 after treatment, BDNF levels were evaluated as a possible early protection mechanism of the EE.

*Results.* CS administration produced a sustained IOP increase that remained unchanged when there was exposure to an EE or SE. Ten weeks after treatment, in eyes injected with CS kept in a SE, there was a reduction in OP and VEP amplitudes, as well as a reduction in the number of RGCs and axons. Chronic ocular hypertension induced an increase in the Iba(+) retinal area after 10 weeks. In the proximal area of the ON, CS administration produced an increase in the Iba(+) area, a reduction in the pNFH(+) area, as well as demyelination signs evidenced by a reduction in the MBP(+) area. These disturbances were prevented by exposure to an EE. Six weeks after treatment an increase in BDNF levels in the retinas of eyes injected with CS of animals kept in an EE was observed.

*Conclusion.* These results suggest that exposure to an EE might prevent retinal and ON glaucomatous changes by a BDNF-dependent mechanism.

Exposição a um ambiente enriquecido como estratégia terapêutica em um modelo de glaucoma experimental

*Objetivos.* O glaucoma, uma das principais causas de cegueira, envolve a morte das células ganglionares retinianas (CGR) e a perda de axônios do nervo óptico (NO). O principal fator de risco para o desenvolvimento da neuropatia óptica glaucomatosa é o aumento crônico da pressão intraocular (PIO). Porém, em uma porcentagem de pacientes com controle efetivo da PIO, a progressão das alterações visuais persiste. Neste trabalho analisamos o efeito da exposição a um ambiente enriquecido (AE) sobre as alterações da retina e do NO em um modelo de glaucoma experimental induzido por injeções de condroitín sulfato (CS).

*Métodos.* Injetaram-se semanalmente rato *Wistar* macho adultos com veículo ou CS em câmara anterior e se albergaram em ambiente standard (AS) ou AE durante 10 semanas. Registraram-se os potenciais oscilatórios (PO) por eletrorretinografia e os potenciais visuais evocados (PVE) através de eletrodos em córtex visual primária às 10 semanas de tratamento. Além disso, se analisou o número de CGR (imunoreatividade para Brn3a), o número de axônios no NO por azul de toluidina e marcadores axogliais em retina e NO (microglia/macrófagos: Iba-1; axônios: neurofilamento fosforilado [pNFH]; mielina: proteína básica da mielina [MBP]) por imunohistoquímica. Às 6 semanas de tratamento se analisaram os níveis de BDNF como possível mecanismo de proteção precoce do AE.

*Resultados.* A administração de CS provocou um crescimento sustentado da PIO que não se modificou pela exposição a AS ou AE. Às 10 semanas de tratamento, nos olhos injetados com CS dos animais hospedados em AS, se evidenciou uma redução nas amplitudes dos PO e dos PVE, assim como uma diminuição no número de CGR e de axônios. A hipertensão ocular crônica induziu um aumento do área Iba(+) na retina às 10 semanas. Na região proximal do NO, a administração de CS produziu um incremento no área Iba1(+), uma redução na área



pNFH(+), assim como signos de desmielinização evidenciados por uma diminuição na área MBP(+). Estas alterações foram prevenidas pela exposição ao AE. Às 6 semanas de tratamento, se observou um aumento nos níveis de BDNF em retinas dos olhos injetados com CS dos animais hospedados em AE.

**Conclusão.** Estes resultados sugerem que a exposição a um AE poderia prevenir as alterações glaucomatosas na retina e o NO por um mecanismo dependente de BDNF.

17

## Análisis proteómico en pterigión primario avanzado

Suárez MF<sup>a</sup>, Barros MF<sup>b</sup>, González-Castellanos A<sup>b</sup>, Guantay C<sup>b</sup>, Urrets-Zavalía JA<sup>b</sup>, Serra HM<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Bioquímica Clínica, CIBICI CONICET, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.

<sup>b</sup> Servicio de Oftalmología, Clínica Universitaria Reina Fabiola, Universidad Católica de Córdoba, Argentina.  
hserra@fcq.unc.edu.ar

**Objetivos.** El pterigión se caracteriza por el crecimiento anormal en forma alada, de tejido epitelial y fibrovascular desde el limbo esclerocorneal que invade centripetamente la córnea. Nuestro grupo realizó estudios proteómicos comparando especímenes provenientes de pacientes con pterigión avanzado y conjuntiva normal.

**Métodos.** Se extrajo tejido conjuntival de zonas afectadas y no afectadas de conjuntiva de pacientes con pterigión en estado avanzado que no presentaban otra enfermedad de la superficie ocular. Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo con la Declaración de Helsinki. Los especímenes fueron sujetos a extracción de proteínas seguida por su fraccionamiento con digestión “en solución”. El análisis de proteómica por espectrometría de masas se realizó en Orbitrap Q-Exactive (Thermo Fisher) y los resultados se analizaron usando el *software* Thermo proteome discoverer 2.1 con las apropiadas bases de datos.

**Resultados.** Las glicoproteínas más abundantes encontradas en pterigión fueron moléculas unidoras de proteínas (32,76%), seguido de moléculas con actividad catalítica (17,60%). Las glicoproteínas involucradas en la regula-

ción de procesos biológicos fueron más ricas que las involucradas en procesos metabólicos (23,25% vs. 21,85%). Los componentes celulares glicoproteicos fueron principalmente de citoplasma y citosol (28,89%), mientras que los componentes de membrana representaron el 23,63%. Obtuvimos un perfil de proteínas para pterigión y conjuntiva normal. Los perfiles comparativos entre ambos tipos de especímenes mostraron la presencia de glicoproteínas comunes (192) y glicoproteínas únicas tanto en pterigión como en conjuntiva normal (473 vs. 272), respectivamente. Entre las glicoproteínas únicamente encontradas en pterigión podemos mencionar muchas proteínas séricas involucradas en respuesta inmune; en cascada de coagulación; transportador de vitamina D; proteína de reparación de escisión por radiación ultravioleta (RUV) RAD23 homólogo B; deshidrogenasas; proteína 1 unidora de PAX3 y PAX7; subunidades de proteasoma; HSP 90; proteínas S100-A10 y A11; carboxipeptidasas de mastocitos; proteína unidora de GTP relacionada a Rho; factores de crecimiento de fibroblastos; proteína unidora de receptor de virus de hepatitis B; factor derivado de epitelio pigmentario y citoqueratinas.

**Conclusión.** Las glicoproteínas únicamente encontradas en pterigión sostienen el concepto de que su génesis involucra mecanismos multifactoriales tales como prolongada exposición a la RUV, estrés oxidativo, angiogénesis, procesos inflamatorios inmunes, comportamiento anormal de las células troncales del limbo, desbalance entre factores de crecimiento y apoptóticos, así como también transición epitelio-mesenquimal.

**Agradecimiento.** FONCyT 2016-0055; SECyT-UNC.

Proteomic analyses in advanced primary pterygium

**Objectives.** Pterygium is characterized by a wing-shaped abnormal growth of epithelial and fibrovascular tissue from the sclerocorneal limbus that invades the cornea centripetally. Our group conducted proteomic studies comparing specimens collected from patients with advanced pterygium and normal conjunctiva.

**Methods.** Conjunctival tissue from the affected and unaffected areas of the conjunctiva was collected from patients with pterygium at an advanced stage who had no other ocular surface diseases. All procedures were performed in accordance with the Declaration of Helsinki. Protein extraction, followed by their in-solution digestion fractionation, was performed on all specimens. Proteomic analyses by mass spectrometry were carried out in the Orbitrap Q-Exactive (Thermo Fisher) and results were analyzed using the Thermo proteome discoverer 2.1 software with adequate databases.

**Results.** The most abundant glycoproteins found in pterygia were protein binding molecules (32.76%), followed by catalytic activity molecules (17.60%). Glycoproteins involved in the regulation of biologic processes were richer than those involved in metabolic processes (23.25% vs. 21.85%). Glycoprotein cell components were mainly from the cytoplasm and cytosol (28.89%), while membrane components accounted for 23.63%. Protein profiles for pterygium and normal conjunctiva were also obtained. Comparative profiles between both types of specimens evidenced the presence of common glycoproteins (192) and single glycoproteins both in pterygia and normal conjunctivas (473 vs. 272), respectively. Among the glycoproteins only found in pterygia are: many serum proteins involved in immune response, proteins of the coagulation cascade, vitamin D transporter, ultraviolet radiation (UVR) excision repair protein RAD23 homologue B, dehydrogenase, PAX3 and PAX7 binding protein 1, proteasome subunits, HSP 90, proteins S100-A10 and A11, mast cell carboxypeptidase, GTP-binding protein Rho, fibroblast growth factor, hepatitis B virus receptor binding protein, pigment epithelium-derived factor and cytokeratins.

**Conclusion.** Glycoproteins found only in pterygia support the concept that their genesis involves multifactorial mechanisms such as prolonged UVR exposure, oxidative stress, angiogenesis, immune inflammatory processes, abnormal behavior of limbal stem cells, imbalance between growth and apoptotic factors as well as epithelial-mesenchymal transition.

**Acknowledgements.** FONCyT 2016-0055; SECyT-UNC.

### Análise proteômica em pterígio primário avançado

**Objetivos.** O pterígio se caracteriza pelo crescimento anormal em forma alada, de tecido epitelial e fibrovascular desde o limbo esclerocorneano que invade de forma centrípeta a córnea. Nosso grupo realizou estudos proteômicos comparando espécimes provenientes de pacientes com pterígio avançado e conjuntiva normal.

**Métodos.** Extraíu-se tecido conjuntival de zonas afetadas e não afetadas de conjuntiva de pacientes com pterígio em estado avançado que não apresentavam outra doença da superfície ocular. Todos os procedimentos se realizaram conforme com a Declaração de Helsinki. Os espécimes foram sujeitos a extração de proteínas seguida por seu fracionamento com digestão “em solução”. A análise de proteômica por espectrometria de massas se realizou em Orbitrap Q-Exactive (Thermo Fisher) e os resultados se analisaram usando o *software* Thermo proteome discoverer 2.1 com as apropriadas bases de dados.

**Resultados.** As glicoproteínas mais abundantes encontradas em pterígio foram moléculas ligadoras de proteínas (32,76%), seguido de moléculas com atividade catalítica (17,60%). As glicoproteínas envolvidas na regulação de processos biológicos foram mais ricas que as envolvidas em processos metabólicos (23,25% vs. 21,85%). Os componentes celulares glicoproteicos foram principalmente de citoplasma e citosol (28,89%), enquanto os componentes de membrana representaram 23,63%. Obtivemos um perfil de proteínas para pterígio e conjuntiva normal. Os perfis comparativos entre ambos os tipos de espécimes mostraram a presença de glicoproteínas comuns (192) e glicoproteínas únicas tanto em pterígio quanto em conjuntiva normal (473 vs. 272), respectivamente. Entre as glicoproteínas unicamente encontradas em pterígio podemos mencionar muitas proteínas séricas envolvidas em resposta imune; em cascata de coagulação; transportador de vitamina D; proteína de reparação de cisão por radiação ultravioleta (RUV) RAD23 homólogo B; deshidrogenases; prote-

ína 1 ligadora de PAX3 y PAX7; subunidades de proteassoma; HSP 90; proteínas S100-A10 e A11; carboxipeptidasas de mastócitos; proteína ligadora de GTP relacionada a Rho; fatores de crecimiento de fibroblastos; proteína ligadora de receptor de vírus de hepatitis B; fator derivado de epitélio pigmentar e citoqueratinas.

*Conclusão.* As glicoproteínas unicamente encontradas em pterígio, sustentam o conceito de que sua gênese envolve mecanismos multifatoriais tais como prolongada exposição à RUV, estresse oxidativo, angiogênese, processos inflamatórios imunes, comportamento anormal das células troncais do limbo, desequilíbrio entre fatores de crescimento e apoptóticos e transição epitélio-mesenquimal.

*Agradecimento.* FONCyT 2016-0055; SECyT-UNC.

---

18

---

## Adhesión al examen anual de fondo de ojos en personas con diabetes luego de implementar un programa de salud basado en telediagnóstico en la provincia de La Pampa

Ortiz Basso, Tomás  
 Centro Oftalmológico, Santa Rosa, La Pampa, Argentina.  
 tomasortizbasso@gmail.com

La diabetes es uno de los principales problemas que enfrenta la salud pública en el siglo XXI. Su prevalencia alcanza al 9% de la población mundial y se pronostica que siga en aumento durante las próximas décadas. Sus complicaciones imponen elevados costos humanos, sociales y económicos. Si no se empiezan a tomar estrategias globales de prevención, la sociedad puede verse muy afectada.

La retinopatía diabética es una de las principales complicaciones de las personas con diabetes, estimándose que hasta un 50% de ellos tienen algún grado de retinopatía al momento del diagnóstico. Además, hasta el 10% presenta una retinopatía con amenaza visual severa, siendo la principal causa de pérdida de visión en personas adultas en edad laboral.

La ceguera por diabetes puede reducirse hasta en un 50% con un tratamiento médico

adecuado; para ello es fundamental diagnosticar la retinopatía en forma temprana. Las guías clínicas recomiendan un examen anual de fondo de ojos. Sin embargo, sólo un tercio adhiere a esta recomendación. Esto se debe principalmente a barreras geográficas, a falta de información y a falta de acceso a médicos especialistas. Esta problemática se observa con mayor frecuencia en áreas rurales.

La telemedicina o e-salud surge como una alternativa para afrontar este problema. El uso de tecnología de la información y de la comunicación podría ofrecerles a las personas que se encuentran alejadas la posibilidad de realizarse un examen anual de fondo de ojos y detectar en forma temprana las lesiones ocasionadas por la diabetes. Existen estudios que demuestran al telediagnóstico como una estrategia costo-efectiva para abordar este problema y muchos países del mundo lo empezaron a adoptar como programa de tamizaje en forma exitosa. La Argentina es un país que carece aún de un programa similar para mejorar el acceso de personas con diabetes.

Se propone investigar la implementación de un programa de salud basado en tele-diagnóstico, evaluando si mejora la adhesión al examen anual de fondo de ojos en personas con diabetes tipo 2 de la zona rural de la provincia de La Pampa.

Adherence to annual funduscopy in people with diabetes after implementing an e-health program in the province of La Pampa

Diabetes is one of the main problems public healthcare has to face in the 21st Century. Its prevalence amounts to 9% of the world population and it is predicted that it will continue to grow during the next decades. Its complications impose burdensome human, social and economic costs. Therefore, if global prevention strategies fail to be implemented, society will be severely affected.

Diabetic retinopathy is one of the main complications for people with diabetes and it has been estimated that up to 50% of them already have some degree of retinopathy when diag-

nosed. Furthermore, retinopathy is a severe visual challenge, it is present in up to 10% of patients and it is the main cause of visual loss in adults of working age.

Blindness due to diabetes can be reduced as much as 50% with adequate medical treatment, but early diagnosis is vital to achieve this. Clinical guidelines recommend an annual funduscopy, however, only one third of patients comply with this recommendation. This is due mainly to geographic barriers and to lack of information and specialized physicians. This problem is more commonly observed in rural areas.

Telemedicine or e-health emerges as an alternative to deal with this problem. Use of information and communication technology might offer access to funduscopy to people who live far away from the availability of funduscopy and early detection of diabetes-related damage. There are several studies establishing telediagnosis as a cost-effective strategy to approach this problem, and many countries throughout the world have started adopting it as a successful screening program. Argentina still lacks any similar program to improve access of people with diabetes to this.

The purpose of this paper is to investigate how to implement a telediagnosis-based health-care program and whether adherence to annual funduscopy for people with type 2 diabetes of the rural area of the province of La Pampa, can be improved.

Adesão ao exame anual de fundo de olhos em pessoas com diabetes logo de implementar um programa de saúde baseado em telediagnóstico na província de La Pampa

A diabetes é um dos principais problemas que enfrenta a saúde pública no século XXI. Sua prevalência alcança 9% da população mundial e se prognostica que continue em aumento durante as próximas décadas. Suas complicações impõem elevados custos humanos, sociais e econômicos. Se não começamos a implementar estratégias globais de prevenção, a sociedade pode verse muito afetada.

A retinopatia diabética é uma das principais complicações das pessoas com diabetes, estiman-

do-se que até 50% deles tem algum grão de retinopatia no momento do diagnóstico. Além disso, até 10% apresenta uma retinopatia com ameaça visual severa, sendo a principal causa de perda de visão em pessoas adultas em idade ativa.

A cegueira por diabetes pode reduzir-se até 50% com um tratamento médico adequado; para isso é fundamental diagnosticar a retinopatia em forma precoce. Os guias clínicos recomendam um exame anual de fundo de olhos. Porém, apenas um tercio adere a esta recomendação. Isso se deve principalmente a barreiras geográficas, a falta de informação e a falta de acesso a médicos especialistas. Esta problemática se observa com maior frequência em áreas rurais.

A telemedicina ou e-saúde surge como uma alternativa para enfrentar este problema. O uso de tecnologia da informação e da comunicação poderia oferecer às pessoas afastadas da possibilidade de realizar-se um exame anual de fundo de olhos e detectar em forma precoce as lesões ocasionadas pela diabetes. Existem estudos que demonstram a telediagnóstico como uma estratégia custo-efetiva para abordar este problema e, muitos países do mundo começaram a adotá-lo como programa de peneiração com sucesso. Argentina é um país que ainda carece de um programa semelhante para melhorar o acesso de pessoas com diabetes.

Propõe-se pesquisar a implementação de um programa de saúde baseado no telediagnóstico, avaliando se melhora a adesão ao exame anual de fundo de olhos em pessoas com diabetes tipo 2 da zona rural da província de La Pampa.

### **Alfa-1-antitripsina como modulador de la expresión de IRS1 durante el tratamiento de la retinopatía diabética**

Petrigliano M, Potilinski MC, Gallo JE.  
*Instituto de Investigaciones en Medicina Traslacional, Universidad Austral-CONICET, Pilar, Buenos Aires, Argentina.*  
petrigliano.micaela@gmail.com

La retinopatía diabética (RD) es una complicación común de la diabetes mellitus y es una de las principales causas evitables de ceguera. Múltiples tratamientos se encuentran disponi-

bles a la fecha, incluyendo fotocoagulación por láser, intervenciones quirúrgicas tempranas y farmacoterapias. Previos estudios realizados por nuestro grupo de trabajo demuestran que la alfa-1-antitripsina (A1AT), una proteína de la familia de las serpinas, resulta eficaz en el tratamiento de la RD por medio de mecanismos antiinflamatorios. En este trabajo nos enfocamos en el estudio de las cascadas moleculares resultantes de ese tratamiento con A1AT.

El sustrato de receptor de insulina I (IRS1) es una proteína que podría modular varios procesos celulares por insulina. Cuando es fosforilado por el receptor de insulina se une específicamente a varias proteínas que contienen dominios SH2, tal como la subunidad p85 de kinasa de fosfatidilinositol-3, activándolas.

En este trabajo analizamos la expresión de IRS1 en un modelo *in vitro* de RD bajo diferentes tratamientos con la A1AT.

Células ARPE-19 (ATCC® CRL-2302®, Manassas, Virginia, USA) se cultivaron en DMEM/F12 (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) con 2  $\mu$ M L-glutamina, 100 U/ml penicilina, 100  $\mu$ g/ml estreptomycin y 10% de SFB. Las células (pasajes 9 a 12) del primer tratamiento se incubaron *over night* con DMEM 5,5 mM glucosa (control), DMEM 5,5 mM glucosa + 4.5mg/ml A1AT (control+A1AT), DMEM 30 mM glucosa (diabéticas), DMEM 30 mM glucosa + 4.5 mg/ml A1AT (diabéticas+A1AT). Para el segundo tratamiento se incubaron *ON* sin A1AT y luego se añadió la A1AT y se las incubó nuevamente *ON*. Para el tercer tratamiento se las incubó *ON* sin A1AT, luego se agregó la A1AT y se las incubó *ON*, y finalmente se retiró la A1AT y se las volvió a incubar *ON* antes de cosecharse en buffer RIPA para su análisis por *Western blot*.

Los resultados son significativos bajo los tratamientos con A1AT posteriores al desarrollo de la enfermedad. Se puede observar cómo en las células con modelo de diabetes los niveles de IRS1 aumentan y luego, con el tratamiento con A1AT, disminuyen. Esta variación afecta a toda la vía de señalización, incluyendo a los receptores GLUT. Por lo tanto se puede estimar que resultaría un tratamiento prometedor para la RD en los casos en los que el daño se haya instalado.

Alpha-1 antitrypsin as a modulator of IRS1 expression during treatment of diabetic retinopathy

Diabetic retinopathy (DR) is a common complication of diabetes mellitus and one of the leading preventable causes of blindness. Multiple therapies are currently available, including laser photocoagulation and early surgical interventions and pharmacotherapies. Previous studies conducted by our working group demonstrate that alpha-1 antitrypsin (A1AT), a protein of the serpin family, is efficacious in the treatment of DR via anti-inflammatory mechanisms. In this paper we focus on the study of the molecular cascades resulting from treatment with A1AT.

The insulin receptor substrate (IRS1) is a protein, thought to modulate several cell processes by insulin. When it is phosphorylated by the insulin receptor it specifically binds to several proteins containing SH2 domains, such as the p85 subunit of phosphatidylinositol 3-kinase, and activates them.

In this paper we analyze IRS1 expression in an *in vitro* model of DR under different treatments with A1AT.

ARPE-19 cells (ATCC™ CRL-2302™, Manassas, Virginia, U.S.) were cultured in DMEM/F12 (Invitrogen, Carlsbad, California, U.S.) with 2  $\mu$ M L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100  $\mu$ g/ml streptomycin and 10% SFB. Cells (passages 9 to 12) of the first treatment were incubated overnight with DMEM 5.5 mM glucose (control), DMEM 5.5 mM glucose + 4.5 mg/ml A1AT (control + A1AT), DMEM 30 mM glucose (diabetic), and DMEM 30 mM glucose + 4.5 mg/ml A1AT (diabetic + A1AT). For the second treatment they were incubated overnight with no A1AT, which was added later to incubate them overnight again. For the third treatment they were incubated overnight with no A1AT, which was added later to incubate them overnight, and finally, A1AT was removed and they were incubated overnight again in RIPA buffer before harvesting them for their analysis with Western blot.

Results obtained under treatment with A1AT after development of the disease are significant. It has been observed that in cells of the dia-

betes model, IRS1 levels rise to subsequently decrease, with A1AT treatment. This variation affects the whole signaling pathway, including GLUT receptors. Therefore, we think this might become a promising treatment for DR in cases in which damage has already occurred.

Alfa-1-antitripsina como modulador da expressão de IRS1 durante o tratamento da retinopatia diabética

A retinopatia diabética (RD) é uma complicação comum da diabetes mellitus e é uma das principais causas evitáveis de cegueira. Múltiplos tratamentos se encontram disponíveis hoje, incluindo fotocoagulação por laser, intervenções cirúrgicas precoces e fármacoterapias. Prévios estudos realizados por nosso grupo de trabalho demonstram que a alfa-1-antitripsina (A1AT), uma proteína da família das serpinas, resulta eficaz no tratamento da RD por meio de mecanismos anti-inflamatórios. Neste trabalho nos focamos no estudo das cascatas moleculares resultantes desse tratamento com A1AT.

O substrato de receptor de insulina I (IRS1) é uma proteína que poderia modular vários processos celulares por insulina. Quando é fosforilado pelo receptor de insulina se une especificamente a várias proteínas que contem domínios SH2, como a subunidade p85 de quinase de fosfatidilinositol-3, ativando-as.

Neste trabalho analisamos a expressão de IRS1 em um modelo *in vitro* de RD sob diferentes tratamentos com a A1AT.

Células ARPE-19 (ATCC® CRL-2302®, Manassas, Virginia, USA) foram cultivadas em DMEM/F12 (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) com 2 µM L-glutamina, 100 U/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomicina e 10% de SFB. As células (passagens 9 a 12) do primeiro tratamento se incubaram *over night* com DMEM 5,5 mM glucose (controle), DMEM 5,5 mM glucose + 4.5 mg/ml A1AT (controle +A1AT), DMEM 30 mM glucose (diabéticas), DMEM 30 mM glucose + 4.5mg/ml A1AT (diabéticas+A1AT). Para o segundo tratamento se incubaram *ON* sem A1AT e logo se incluiu a A1AT e foram novamente incubadas *ON*. Para o terceiro tra-

tamento, foram incubadas *ON* sem A1AT, logo se acrescentou a A1AT e foram incubadas *ON*, e finalmente se retirou a A1AT e foram novamente incubadas *ON* antes de colher-se em buffer RIPA para sua análise por *Western blot*.

Os resultados são significativos baixo os tratamentos com A1AT posteriores ao desenvolvimento da doença. Pode-se observar como nas células com modelo de diabetes, os níveis de IRS1 aumentam e logo, com o tratamento com A1AT, diminuem. Essa variação afeta a toda a via de sinalização, incluindo aos receptores GLUT. Pelo tanto se pode estimar que resultaria um tratamento promissor para a RD nos casos nos que o dano tenha se instalado.

---

20

---

### Propuesta de sistema de información basado en norma DICOM para aplicaciones oftalmológicas orientadas a retinopatías del prematuro (ROP)

Salvatelli A<sup>a</sup>, Bizai G<sup>a</sup>, Drozdowicz B<sup>a</sup>, Hadad A<sup>a</sup>, Evin D<sup>a</sup>, Torres RM<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Laboratorio de Sistemas de Información, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Entre Ríos, Oro Verde, Entre Ríos, Argentina.

<sup>b</sup> Centro de Ojos Dr. Lódolo, Paraná, Entre Ríos.  
asalvatelli@ingenieria.uner.edu.ar

**Objetivos.** Las doctoras G. Saidman (SG) y G. Monteoliva (MG) han desarrollado un sistema de registro con un casco tipo oftalmoscopio indirecto y un teléfono celular, dejando las manos libres y obteniendo videos del fondo de ojos y evaluación de la ROP. Se propone definir líneas de trabajo en sistemas de análisis y mejora de imágenes con la finalidad de aportar valor agregado al diagnóstico, seguimiento y procesos de aprendizaje y formación de los profesionales relacionados con la ROP.

**Métodos.** Evaluando videos que utilizan actualmente SG y MG se procede a: 1. estandarizar y normalizar imágenes y/o video con técnicas de procesamiento digital de imágenes y visión por computadora. 2. Conformación de un *smartphone* como una modalidad de imágenes y conformación a norma del archivo de video e imágenes DICOM 3. Aplicación de métodos

de “bigdata, machine learning y convolutional neural network” para clasificación, seguimiento y análisis de metadatos de información.

**Resultados.** 1. *Estandarización y normalización de imágenes y video:* se han llevado estos videos e imágenes a un rango dinámico de color único, a un rendimiento de color estándar y a un brillo y contraste único; además de medir su tolerancia al ruido y segmentar el fondo retinal de toda la imagen automáticamente, y de conformar (registrar) el fondo retinal automáticamente. 2. *Conformación de un smartphone como una modalidad de imágenes:* implementando una app que conforme al equipo y las imágenes en estándar DICOM, que soporta manejo de bases de datos web, asegura el envío con gran calidad y su integración con un PACS (*picture archiving and communication system*) de imágenes médicas y mensajería de un HIS (hospital information system). Esto garantiza que una red de telemedicina comparta “la misma imagen” sin pérdida de información garantizando la legalidad de la información. 3. *Aplicación de métodos de bigdata, machine learning, convolutional neural network:* para analizar imágenes estándar desde una base de datos y con grandes volúmenes de información, que permitan encontrar información relevante (que se puede pasar por alto), clasificarla y realizar un análisis inteligente de datos e imágenes.

**Conclusiones.** Se han definido líneas de trabajo donde la interacción multidisciplinaria está permitiendo mejorar el procesamiento de imágenes para otorgar mayor seguridad, reproducibilidad y eficacia en ROP. Este trabajo podría ampliarse a la evaluación de imágenes en otras patologías, tales como retinopatía diabética y degeneración macular senil.

Information system proposal based on DICOM standard for ophthalmologic applications oriented to retinopathies of prematurity (ROP)

**Objectives.** Drs. Saidman (SG) and G. Monteliva (MG) have developed a recording system using a helmet similar to that of indirect ophthalmoscopy and a mobile phone. This hands-free system acquires videos of the eye fundus

and features evaluation of ROP. The purpose is to define workstrands in analysis systems and enhance imaging in order to provide added value to diagnosis, follow-up and learning, and training processes for ROP-related professionals.

**Methods.** After evaluating the videos currently used by SG and MG, the following was carried out: 1. Image and/or video standardization and normalization with computerized digital processing of images and views. 2. Conformation of a smartphone as an imaging modality and recording imagery files containing both still images and clips according to the DICOM 3 standard. Application of bigdata, machine learning and convolutional neural network methods for the classification, follow-up and analysis of metadata of information.

**Results.** 1. *Standardization and normalization of images and videos:* these videos and images have been taken to a unique-color dynamic range, a standard-color performance and unique brightness/contrast, in addition to measuring their noise tolerance and segmenting the retinal fundus of the whole image automatically and conforming (recording) the retinal fundus automatically. 2. *Conformation of a smartphone as an imaging modality:* by implementing an app in accordance with the device and DICOM compliant standard images, supporting the management of web databases, ensuring that high-quality data are sent and their integration with a Picture Archiving and Communication System (PACS) of medical images and hospital information system (HIS) messaging. This ensures that a telemedicine network shares “the same image” with no information loss and guaranteeing the lawfulness of information. 3. *Application of big-data methods, machine learning, convolutional neural network:* for the analysis of standard images from a database and with large volumes of information, thus enabling relevant information (that may otherwise be overlooked) to be found and classified, and allowing for a smart analysis of data and images.

**Conclusions.** Workstrands have been defined by which multidisciplinary interaction facilitates improved image processing to provide greater safety, reproducibility and efficacy in

ROP. This study might be furthered so that the system can be used to evaluate other diseases, such as diabetic retinopathy and senile macular degeneration.

Proposta de sistema de informação baseado em norma DICOM para aplicações oftalmológicas orientadas a retinopatias do prematuro (ROP)

**Objetivos.** As doutoras G. Saidman (SG) e G. Monteoliva (MG) tem desenvolvido um sistema de registro com um capacete tipo oftalmoscópio indireto e um telefone celular, deixando-o as mãos livres e obtendo vídeos do fundo de olhos e avaliação da ROP. Propõe-se definir linhas de trabalho em sistemas de análise e melhora de imagens com a finalidade de contribuir valor agregado ao diagnóstico, seguimento e processos de aprendizagem e formação dos profissionais relacionados com a ROP.

**Métodos.** Avaliando vídeos que utilizam atualmente SG e MG se procede a: 1. Estandarizar e normalizar imagens e/ou vídeo com técnicas de processamento digital de imagens e visão por computador. 2. Conformação de um *smartphone* como uma modalidade de imagens e conformação a norma do arquivo de vídeo e imagens DICOM 3. Aplicação de métodos de “bigdata, machine learning e convolutional neural network” para classificação, seguimento e análise de metadados de informação.

**Resultados.** 1. *Estandarização e normalização de imagens e vídeo:* tem se levado estes vídeos e imagens a uma faixa dinâmica de cor único, a um rendimento de cor standard e a um brilho e contraste único; além de medir sua tolerância ao barulho e segmentar o fundo da retina de toda a imagem automaticamente, e de conformar (registrar) o fundo da retina automaticamente. 2. *Conformação de um smartphone como uma modalidade de imagens:* implementando uma app que conforme a equipe e as imagens em standard DICOM, que suporta gestão de bases de dados web, assegura o envio com grande qualidade e sua integração com um PACS (*picture archiving and communication system*) de imagens médicas e mensagens de um HIS (hospital

information system). Isso garante que uma rede de telemedicina compartia “a mesma imagem” sem perda de informação garantindo a legalidade da informação. 3. *Aplicação de métodos de bigdata, machine learning, convolutional neural network:* para analisar imagens standard desde uma base de dados e com grandes volumes de informação, que permitam encontrar informação relevante (que se pode ignorar), classificar ela e realizar uma análise inteligente de dados e imagens.

**Conclusões.** Tem se definido linhas de trabalho nas que a interação multidisciplinar está permitindo melhorar o processamento de imagens para outorgar maior segurança, reprodutibilidade e eficácia em ROP. Este trabalho poderia ampliar-se à avaliação de imagens em outras patologias, como retinopatia diabética e degeneração macular senil.

### Células stem/progenitoras: su potencial efecto neuroprotector en retinas fotodegeneradas de ratas

Barreiro, Mariana; Soliño, Manuel; López, Ester M.; Rey-Funes, Manuel; Loidl, César F.; López-Costa, Juan J.

*Instituto de Biología Celular y Neurociencia “Prof. E. De Robertis” (IBCN-CONICET), Facultad de Medicina (UBA), Buenos Aires, Argentina.*

maia\_bareiro@hotmail.com

**Objetivo.** La pérdida de neuronas es la causa de múltiples enfermedades neurodegenerativas tanto a nivel del SNC como de la retina. En esta última, entre las enfermedades de mayor importancia, se encuentran la degeneración asociada con la edad (DMAE) y la retinitis pigmentosa (RP). En nuestro laboratorio empleamos un modelo experimental de degeneración retinal sometiendo ratas Sprague Dawley a iluminación continua. Este modelo remedia lo que ocurre en el ser humano y permite estudiar nuevas estrategias terapéuticas en el tratamiento de la DMAE. El uso de células madre/progenitoras (SC) se ha convertido en un potencial tratamiento de las enfermedades degenerativas. El objetivo del presente trabajo fue aislar y reproducir las SC de



la retina en neuroesferas (NS) para inyectarlas por vía intravítrea a los ojos fotodegenerados y estudiar el posible efecto terapéutico de las SC.

*Materiales y métodos.* Las SC de la retina se aislaron de la zona marginal ciliar de retinas de ratas neonatales. Las células se disociaron mecánicamente y se cultivaron en un medio de promoción de NS. Simultáneamente, se sometieron ratas Sprague Dawley adultas a iluminación continua (12.000 lux) durante 2, 5 y 7 días. Luego fueron inyectadas por vía intravítrea en un ojo con 5  $\mu$ l de SC ( $5 \times 10^3$  células) y en los contralaterales con vehículo como control. Una semana después los ojos se procesaron por inmunocitoquímica usando un anticuerpo primario anti-GFAP y la técnica de TUNEL.

*Resultados.* Los resultados preliminares demuestran que el tratamiento con SC de las retinas no evita la degeneración inducida por luz pero en todos los tiempos de iluminación estudiados se observó una disminución de la reactividad glial. Asimismo, si bien se observa apoptosis en la capa nuclear externa, las primeras observaciones revelan una tendencia a la disminución indicando un efecto protector en las retinas tratadas.

*Conclusión.* Postulamos que las SC podrían moderar la lesión de la retina a través de la secreción de factores tróficos con diversas propiedades, entre ellas propiedades antiinflamatorias con efectos beneficiosos lo que induce a profundizar sus conocimientos mecánicos para mejorar el diseño de terapias regenerativas.

*Subsidio.* Universidad de Buenos Aires, UBACYT 200-20130100675BA.

Stem/progenitor cells: their potential neuroprotective effect in rat photodegenerated retinas

*Objective.* Neuron loss is the cause of multiple neurodegenerative diseases, both at the CNS and retinal levels. In the latter case, among more significant diseases, we can mention age-related macular degeneration (ARMD) and retinitis pigmentosa (RP). In our laboratory we have used an experimental model of retinal degeneration by exposing Sprague Dawley rats to continuous illumination. This model mimics what happens

to the human being and enables new therapeutic strategies for the treatment of ARMD to be studied. Use of stem/progenitor cells (SCs) has become a potential therapy for degenerative diseases. The purpose of this paper was to isolate and reproduce retinal SCs in neurospheres (NS) to inject them intravitreally into photodegenerated eyes and to study their possible therapeutic effect.

*Materials and methods.* Retinal SCs were isolated from the retinas of newborn rats. Cells were mechanically dissociated and cultured in a medium promoting NS. At the same time, adult Sprague Dawley rats were exposed to continuous illumination (12,000 lux) for 2, 5 and 7 days. Then, they were administered intravitreal injections with 5  $\mu$ l of SCs ( $5 \times 10^3$  cells) in one eye, while the contralateral eyes received vehicle and were used as controls. One week later, eyes were processed by immunocytochemistry using an anti-GFAP primary antibody and the TUNEL technique.

*Results.* Preliminary results demonstrate that treatment of retinas with SCs fails to prevent light-induced degeneration, but at all illumination times studied glial reactivity reduction was observed. Likewise, though there was apoptosis of the outer nuclear layer, the first observations reveal a trend towards reduction, thus indicating a protective effect in treated retinas.

*Conclusion.* Therefore, we postulate that SCs might moderate retinal damage by secreting trophic factors with different properties —among others, anti-inflammatory properties—, with beneficial effects, thereby encouraging us to get further insight into the mechanics involved with an aim at improving the design of regenerative therapies.

*Grants.* Universidad de Buenos Aires, UBACYT 200-20130100675BA.

Células stem/progenitoras: seu potencial efeito neuroprotetor em retinas foto-degeneradas de ratos

*Objetivo.* A perda de neurônios é a causa de múltiplas doenças neurodegenerativas tanto no nível do SNC quanto da retina. Nesta última, entre as doenças de maior importância, se

encontram a degeneração associada com a idade (DMAI) e a retinite pigmentosa (RP). Em nosso laboratório empregamos um modelo experimental de degeneração da retina submetendo ratos Sprague Dawley a iluminação contínua. Este modelo imita o que acontece no ser humano e permite estudar novas estratégias terapêuticas no tratamento da DMAI. El uso de células-tronco/progenitoras (SC) tem se convertido em um potencial tratamiento das doenças degenerativas. O objetivo do presente trabalho foi isolar e reproduzir as SC da retina em neuroesferas (NS) para injetá-las por via intravítrea aos olhos foto-degenerados e estudar o possível efeito terapêutico das SC.

**Materiais e métodos.** As SC da retina foram isoladas da zona marginal ciliar (ZMC) de retinas de ratos neonatais. As células se dissociaram mecanicamente e se cultivaram em um meio de promoção de NS. Simultaneamente, foram submetidos ratos Sprague Dawley adultos a iluminação contínua (12.000 lux) durante 2, 5 e 7 dias. Logo foram injetadas por via intravítrea em um olho com 5 ul de SC ( $5 \times 10^3$  células) e nos contralaterais com veículo como controle. Uma semana depois os olhos se processaram por imunocitoquímica usando um anticorpo primário anti-GFAP e a técnica de TUNEL.

**Resultados.** Os resultados preliminares demostram que o tratamento com SC das retinas não evita a degeneração induzida por luz, mas, em todos os tempos de iluminação estudados se observou uma diminuição da reatividade glial. Do mesmo modo, embora se observa apoptose na camada nuclear externa, as primeiras observações revelam uma tendência à diminuição indicando um efeito protetor nas retinas tratadas.

**Conclusão.** Postulamos que as SC poderiam moderar a lesão da retina através da secreção de fatores tróficos com diversas propriedades, entre elas propiedades anti-inflamatórias com efeitos benéficos o que induz a aprofundar seus conhecimentos mecânicos para melhorar o desenho de terapias regenerativas.

**Subsidio.** Universidade de Buenos Aires, UBA-CYT 200-20130100675BA.

## Modulación de la respuesta inflamatoria y antiviral en células del epitelio pigmentario de la retina (EPR) a través de receptores X retinoideos (RXR): posible blanco terapéutico para enfermedades neurodegenerativas

Ayala-Peña, Victoria B.<sup>a,b</sup>; Armiento, Nieves<sup>b</sup>; Scolaro, Luis A.<sup>b</sup>; German, Olga Lorena<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratorio de NeuroVirología, INIBIBB-Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional del Sur-CONICET.

<sup>b</sup> Laboratorio de Virología, Departamento de Química y Biología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires-CONICET.

olgerman@criba.edu.ar

**Objetivos.** La degeneración macular relacionada con la edad (DMAE), principal patología que conduce a la ceguera en adultos, no tiene aún cura o tratamiento efectivo. Las células del epitelio pigmentario de la retina (EPR) tienen propiedades inmunomoduladoras y su degeneración contribuye al desarrollo de la DMAE. El estrés oxidativo está involucrado en la patogénesis de esta enfermedad y la infección por el virus herpes simple tipo 1 (VHS-1) se propone como un factor de riesgo. Demostramos que la activación de los RXR promueve la supervivencia de las células del EPR sometidas a estrés oxidativo, inhibiendo la translocación nuclear de NFκB.

Nuestro actual objetivo es estudiar si un potencial blanco terapéutico, la modulación de los RXR, podría disminuir la inflamación y alterar la respuesta antiviral.

**Métodos.** Para esto, las células del EPR humanas se trataron con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o se infectaron con HSV-1 y se suplementaron con diferentes agonistas selectivos de los RXR (HX630, LG100754 y LG100268). Estudiamos citoquinas pro y anti-inflamatorias mediante qRT-PCR; la liberación de IL-10 por ELISA; la infectividad (título viral y efecto citopático-ECP) y la actividad del interferón (IFN); vía NFκB por IC y WB.

**Resultados.** Nuestros resultados mostraron que 5 h de tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> estimula la transcripción de IL-6 y el pretratamiento con HX630 lo disminuye y aumenta los niveles de ARNm de TGFβ e IL-10. A las 2.5 h, HX630 aumentó la expresión de IL-10 más que a las

5 h, y su aumento no se observó en las células co-tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a las 2.5 h. Además, HX630 promovió la liberación de IL-10 a las 9 h, pero no en las condiciones co-tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, lo que sugiere que este agonista podría estar modulando la liberación de IL-10 más tardíamente. Por otro lado, la infección por VHS-1 generó un ECP característico y el tratamiento con LG100268 lo redujo, como al título viral, lo cual no fue observable en los tratados con LG100754. VHS-1 activó la vía NFκB y disminuyó los niveles de ARNm de TGFβ, pero no alteró la actividad de IFN con respecto de las MOCK. Además, ambos agonistas regularon por disminución la vía de NFκB y la actividad de IFN, pero no lograron revertir la inhibición viral sobre la síntesis de ARNm de TGFβ.

**Conclusiones.** En conjunto, estos resultados sugieren que la activación de los RXR promovería una respuesta antiinflamatoria y la activación de algunas conformaciones de los RXR podrían alterar el curso de la infección viral en las células del EPR.

**Subsidios.** PGI 24/ZB68, UNS; ANPCYT: PICT 2016-0475 y subsidio para investigación médica básica, Fundación Roemmers, 2017.

Modulation of inflammatory and antiviral response in retinal pigment epithelium (RPE) cells by means of retinoid x receptors (RXR): a possible therapeutic target for neurodegenerative diseases

**Objectives.** There is still no cure or effective treatment for age-related macular degeneration (ARMD), the main disease leading to blindness in adults. Retinal pigment epithelium (RPE) cells have immunomodulating properties, and their degeneration contributes to the development of ARMD. Oxidative stress is involved in the pathogenesis of this disease, and herpes simplex virus 1 (HSV-1) infection is proposed as a risk factor. We have demonstrated that RXR activation promotes the survival of RPE cells exposed to oxidative stress by inhibiting NFκB nuclear translocation. Our current goal is to study whether a potential therapeutic target, RXR modulation, can reduce inflammation and influence antiviral response.

**Methods.** For this purpose, human RPE cells were treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or infected with HSV-1, and supplemented with different RXR-selective agonists (HX630, LG100754 and LG100268). We studied pro- and anti-inflammatory cytokines by qRT-PCR; IL-10 release by ELISA; infectivity (viral titer and cytopathic effect [CPE]) and interferon activity (IFN), and the NFκB pathway by IC and WB.

**Results.** Our results evidenced that 5 h of treatment with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stimulates IL-6 transcription, while pretreatment with HX630 decreases it and increases TGFβ and IL-10 mRNA levels. After 2.5 h, with HX630, there was a greater increase in IL-10 expression than after 5 h, and this increase failed to occur in cells co-treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> after 2.5 h. Moreover, HX630 promoted IL-10 release after 9 h, but not in the conditions co-treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, thus suggesting that this agonist might produce delayed modulation of IL-10 release. On the other hand, HSV-1 infection generated a characteristic CPE, and treatment with LG100268 reduced it, as also did with the viral titer, while this was not observed when treated with LG100754. HSV-1 activated the NFκB pathway and reduced TGFβ mRNA levels, but did not alter IFN activity as compared to MOCK. In addition, both agonists downregulated the NFκB pathway and IFN activity, but they could not revert viral inhibition of TGFβ mRNA synthesis.

**Conclusions.** All in all, these results suggest that RXR activation may promote an anti-inflammatory response, and that some RXR conformations may change the course of the viral infection in RPE cells.

**Grants.** PGI 24/ZB68, UNS; ANPCYT: PICT 2016-0475 and funding for basic medical research by Roemmers Foundation, 2017.

Modulação da resposta inflamatória e antiviral em células do epitélio pigmentar da retina (EPR) através de receptores X retinóides (RXR): possível alvo terapêutico para doenças neurodegenerativas

**Objetivos.** A degeneração macular relacionada com a idade (DMRI), principal patologia que conduz à cegueira em adultos, não tem ainda

cura ou tratamento efetivo. As células do epitélio pigmentar da retina (EPR) tem propriedades imunomoduladoras e sua degeneração contribui ao desenvolvimento da DMRI. O estresse oxidativo está envolvido na patogênese desta doença e a infecção pelo vírus herpes simples tipo 1 (VHS-1) se propõe como um fator de risco. Demostramos que a ativação dos RXR promove a supervivência das células do EPR submetidas a estresse oxidativo, inibindo a translocação nuclear de NFκB.

Nosso atual objetivo é estudar se um potencial alvo terapêutico, a modulação dos RXR, poderia diminuir a inflamação e alterar a resposta antiviral.

**Métodos.** Para isso, as células do EPR humanas se trataram com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou se infectaram com VHS-1 e se suplementaram com diferentes agonistas seletivos dos RXR (HX630, LG100754 y LG100268). Estudamos citoquinas pró e anti-inflamatórias por meio de qRT-PCR; a liberação de IL-10 por ELISA; a infetividade (título viral e efeito citopático-ECP) e a atividade do interferon (IFN); via NFκB por IC e WB.

**Resultados.** Nossos resultados mostraram que 5 h de tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> estimula a transcrição de IL-6 e o pré-tratamento com HX630 o diminui e aumenta os níveis de ARNm de TGFβ e IL-10. Às 2.5 h, HX630 aumentou a expressão de IL-10 mais que às 5 h, e seu incremento não se observou nas células co-tratadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> às 2.5 h. Além disso, HX630 promoveu a liberação de IL-10 às 9 h, mas não nas condições co-tratadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, o que sugere que este agonista poderia estar modulando a liberação de IL-10 mais tardiamente. Por outro lado, a infecção por VHS-1 gerou um ECP característico e o tratamento com LG100268 o reduziu, como ao título viral, o que não foi observável nos tratados com LG100754. VHS-1 ativou a via NFκB e diminuiu os níveis de ARNm de TGFβ, mas não alterou a atividade de IFN com respeito das MOCK. Além disso, ambos os agonistas regularam por diminuição a via de NFκB e a atividade de IFN, mas não conseguiram reverter a inibição viral sobre a síntese de ARNm de TGFβ.

**Conclusões.** Em conjunto, estes resultados sugerem que a ativação dos RXR promoveria

uma resposta anti-inflamatória e a ativação de algumas conformações dos RXR poderiam alterar o curso da infecção viral nas células do EPR.

**Subsídios.** PGI 24/ZB68, UNS; ANPCYT: PICT 2016-0475 e subsídio para pesquisa médica básica, Fundação Roemmers, 2017.

## Desarrollo y desempeño de un microsensor para la evaluación de la salud ocular

Zalazar, Martín<sup>a</sup>; Mista, Christian<sup>a</sup>; Torres, Rodrigo M.<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Entre Ríos, Oro Verde, Entre Ríos, Argentina.

<sup>b</sup> Centro de Ojos Dr. Lódolo, Paraná, Entre Ríos.

mazalazar@ingenieria.uner.edu.ar

**Objetivos.** Los problemas de superficie ocular son de alta prevalencia mundial (una de las primeras causas de consulta oftalmológica en el mundo). Las lágrimas tienen primordial importancia para mantener la salud ocular y han sido históricamente evaluadas en la oftalmología por métodos clínicos subjetivos.

Los avances de los sensores a escala micrométrica han revolucionado el campo del diagnóstico clínico. La microbalanza de cristal de cuarzo (QCM) es un dispositivo altamente sensible a las pequeñas variaciones de masa que ocurren en su superficie. Con el uso de una QCM se propone una solución tecnológica original a partir del desarrollo de un dispositivo portable que permite la evaluación de la lágrima para abordar problemas de superficie ocular brindando resultados objetivos.

El presente trabajo caracteriza el desempeño de un microsensor de fluidos basado en una QCM para distinguir distintas lágrimas artificiales comerciales (LA).

**Materiales y métodos.** Se utilizó una placa Digilent Analog Discovery 2TM como analizador de redes escalar para medir las propiedades eléctricas de la QCM y obtener su frecuencia de resonancia (*fr*) y disipación de energía (*D*) cuando trabaja en un medio líquido (LA). La QCM se diseñó y fabricó en el Laboratorio de Prototipado Electrónico e Impresión 3D de la FIUNER.

Las soluciones utilizadas fueron agua ultra pura (bidestilada) y 8 tipos de LA de distinta

composición. Se evaluaron los cambios en  $fr$  y  $D$ , el cual representa un valor indirecto de la relación viscosidad/densidad (fluidez) de la solución depositada. Los resultados se muestran en gráficas de cajas y resumen la estadística descriptiva utilizando 5 medidas: el valor mínimo, el primer cuartil, la mediana, el tercer cuartil y el valor máximo.

**Resultados.** Las muestras 1, 3 y 8 tuvieron un comportamiento muy similar, mientras que las muestras 4 y 7 presentaron menor frecuencia de resonancia.

**Conclusiones.** El sensor desarrollado ha sido capaz de discriminar distintos tipos de composición de las lágrimas artificiales evaluadas. Las muestras 4 y 7 presentaron menor  $fr$  debido a una mayor viscosidad de la lágrima artificial ya que ambas soluciones son geles. Futuros desarrollos nos permitirán evolucionar a un dispositivo comercial de uso clínico para evaluar fluido lagrimal en condiciones de normalidad y patologías de superficie ocular con una toma de muestra simple, no invasiva y de manera reproducible.

**Agradecimientos.** El trabajo fue financiado con los proyectos PICT 2013, PID-UNER 2015 y Programa DTEC.

Development and performance of a microsensor for ocular health evaluation

**Objectives.** Ocular surface disorders are highly prevalent worldwide (they are one of the primary causes of ophthalmologic visits throughout the world). Tears are of vital importance to preserve ocular health and they have been evaluated historically in ophthalmology by subjective clinical methods.

Advances made in micrometric scale sensors have revolutionized the field of clinical diagnosis. The quartz crystal microbalance (QCM) is a device that is highly sensitive to small mass variations occurring on its surface. The use of a QCM emerges as a novel technological solution with the development of a portable device allowing for evaluation of the tear. Ocular surface disorders can thus be approached and objective results can be obtained. This paper characterized the performance of a QCM-based fluid micro-

sensor to distinguish different artificial tears (AT) commercially available.

**Materials and methods.** A Digilent Analog Discovery 2™ board was used as a scale network analyzer to measure the electric properties of the QCM and obtain its resonance frequency ( $rf$ ) and energy dissipation ( $D$ ) when it works in a liquid medium (AT). The QCM was designed and manufactured at the Electronic Prototyping and 3D Printing Laboratory of the School of Engineering of Universidad de Entre Ríos (FIUNER).

Solutions used were ultrapure (bi-distilled) water and 8 types of ATs of different compositions. Changes in  $rf$  and  $D$ , which represent an indirect value of the viscosity/density (fluidity) ratio of the solution deposited, were analyzed. Results are shown in box plots and they summarize the descriptive statistics using 5 measures: lowest value, first quartile, median, third quartile and highest value.

**Results.** Samples 1, 3 and 8 had a very similar behavior, while samples 4 and 7 had a lower  $rf$ .

**Conclusions.** The sensor developed was able to discriminate distinct types of composition of the ATs evaluated. Samples 4 and 7 had a lower  $rf$  due to a greater viscosity of the ATs, since both solutions are gels. Future developments will enable us to improve and obtain a commercially available device for clinical use to evaluate lacrimal fluid under normal and pathologic ocular surface conditions by a single sample collection, and with a non-invasive and reproducible method.

**Acknowledgments.** This paper was funded by Projects PICT 2013, PID-UNER 2015 and Program DTEC.

Desenvolvimento e desempenho de um microsensor para a evacuação da saúde ocular

**Objetivos.** Os problemas de superfície ocular são de alta prevalência mundial (uma das primeiras causas de consulta oftalmológica no mundo). As lágrimas têm primordial importância para manter a saúde ocular e tem sido historicamente avaliada na oftalmologia por métodos clínicos subjetivos.

Os avanços dos sensores a escala micrométrica têm revolucionado o campo do diagnóstico clínico. A microbalança de cristal de quartzo (QCM) é um dispositivo altamente sensível as pequenas variações de massa que ocorrem em sua superfície. Com o uso de uma QCM se propõe uma solução tecnológica original a partir do desenvolvimento de um dispositivo portátil que permite a avaliação da lágrima para abordar problemas de superfície ocular brindando resultados objetivos.

O presente trabalho caracteriza o desenvolvimento de um microsenssor de fluidos baseado em uma QCM para diferenciar distintas lágrimas artificiais comerciais (LA).

**Materiais e métodos.** Utilizou-se uma placa Digilent Analog Discovery 2™ como analisador de redes escalar para medir as propriedades elétricas da QCM e obter sua frequência de ressonância (*fr*) e dissipação de energia (*D*) quando trabalha em um médio líquido (LA). A QCM foi desenhada e fabricada no Laboratório de Prototipação Eletrônico e Impressão 3D da FIUNER.

As soluções utilizadas foram água ultrapura (bidestilada) e 8 tipos de LA de distinta composição. Avaliaram-se as mudanças em *fr* e *D*, o qual representa um valor indireto da relação viscosidade/densidade (fluidez) da solução depositada. Os resultados se mostram em gráficas de caixas e resume a estatística descritiva utilizando 5 medidas: o valor mínimo, o primeiro quartil, a mediana, o terceiro quartil e o valor máximo.

**Resultados.** As mostras 1, 3 e 8 tiveram um comportamento muito semelhante, enquanto as mostras 4 e 7 apresentaram menor frequência de ressonância.

**Conclusões.** O sensor desenvolvido tem sido capaz de discriminar distintos tipos de composição das lágrimas artificiais avaliadas. As mostras 4 e 7 apresentaram menor *fr* devido a uma maior viscosidade da lágrima artificial já que ambas as soluções são geles. Futuros desenvolvimentos nos permitam evolucionar para um dispositivo comercial de uso clínico para avaliar fluido lacrimal em condições de normalidade e patologias de superfície ocular com uma toma de mostra simples, não invasiva e de forma reproduzível.

**Agradecimentos.** O trabalho foi financiado com os projetos PICT 2013, PID-UNER 2015 e Programa DTEC.

## Alfa-1 antitripsina modula la expresión de proteínas inflamatorias y otras proteínas esenciales para la retina en células ARPE-19 con alta glucemia

Potilinski MC, Ortiz GA, Petrigliano M, Gallo JE.  
Instituto de Investigaciones en Medicina Traslacional, Universidad Austral-CONICET, Pilar, Buenos Aires, Argentina.  
constanza.potilinski@gmail.com

La retinopatía diabética (RD) se encuentra asociada a inflamación persistente y al daño en el lecho vascular. El tratamiento actual se encuentra enfocado en las etapas más severas de esta enfermedad. Los resultados previos obtenidos por nuestro grupo muestran que la Alfa-1 Antitripsina (A1AT) actúa como un agente antiinflamatorio que podría jugar un rol en el tratamiento de la RD. De todas maneras, es importante saber cuál es el efecto del tratamiento con A1AT sobre otras proteínas relevantes para el normal funcionamiento de la retina y cuáles son los mecanismos moleculares involucrados. El epitelio pigmentario retinal forma el componente epitelial de la barrera hematorretinal. La conexina43 (Cx43) es la proteína de las uniones gap mayormente expresada en estas células. La sobreexpresión de la Cx43 ha sido asociada al edema y a la pérdida de la integridad vascular. IRS-1 y AS160 se encuentran involucrados en la vía de señalización de la insulina y se ven afectados en la diabetes. NFκB es un factor de transcripción clave en los procesos inflamatorios y se encuentra incrementado en la RD.

Evaluamos la expresión de Cx43, IRS-1, AS160, NFκB y otras proteínas asociadas a diferentes vías de señalización en un modelo *in vitro* de RD.

Células ARPE-19 (ATCC® CRL-2302®, Manassas, Virginia, USA) se cultivaron en DMEM/F12 (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) con 2μM L-glutamina, 100 U/ml penicilina, 100 μg/ml estreptomomicina y 10% SFB. Las células (pases 9 a 12) se incubaron 16h con DMEM 5,5 mM

glucosa (control), DMEM 5,5 mM glucosa + 4.5 mg/ml A1AT (control+A1AT), DMEM 30 mM glucosa (diabéticas), DMEM 30 mM glucosa + 4.5 mg/ml A1AT (diabéticas+A1AT). Las células se cosecharon en buffer RIPA para *Western blot* o se fijaron para inmunohistoquímica.

La A1AT disminuyó la expresión de la Cx43, IRS-1 y AS160 y NFκB. Además, redujo los niveles de expresión de AKT y pAKT1/2/3, indicando la participación de la vía PI3K/AKT. Esta vía se encuentra asociada con las vías de señalización de la insulina y Wnt. A su vez, asociado a la menor expresión de NFκB, se observó una disminución de expresión de iNOS y TNFα.

Estos resultados soportan la hipótesis de que la A1AT modula la expresión de diversas proteínas involucradas en la respuesta inflamatoria y otras que son esenciales para el funcionamiento de la retina a través de las vías de señalización de la insulina, PI3K/AKT y Wnt. Todos estos resultados en su conjunto muestran a la A1AT como una molécula prometedora para el tratamiento de la RD.

Alpha-1 antitrypsin modulates the expression of inflammatory and other proteins that are essential to the retina in ARPE-19 cells exposed to high glycemia

Diabetic retinopathy (DR) is associated with persistent inflammation and damage to the vascular bed, but current treatment is focused on the most severe stages of this disease. Previous results obtained by our group show that alpha-1 antitrypsin (A1AT) acts as an anti-inflammatory agent that might play a role in the treatment of DR. Anyway, it is important to know the effect of A1AT treatment on other proteins relevant to normal retinal function as well as which the molecular mechanisms involved are. The retinal pigment epithelium forms the epithelial component of the blood-retinal barrier. Connexin 43 (Cx43) is the protein of gap junctions having the greatest expression in these cells. Cx43 overexpression has been associated with edema and vascular integrity loss. IRS-1 and AS160 are involved in the insulin signaling pathway and are affected in diabetes. NFκB is a transcription

factor having a key role in inflammatory processes, and it is increased in DR.

We have evaluated the expression of Cx43, IRS-1, AS160, NFκB and other proteins associated with different signaling pathways in a DR *in vitro* model.

ARPE-19 (ATCC™ CRL-2302™, Manassas, Virginia, U.S.) cells were cultured in DMEM/F12 (Invitrogen, Carlsbad, California, U.S.) with 2μM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin and 10% SFB. Cells (passages 9 to 12) were incubated for 16 h with DMEM 5.5 mM glucose (control), DMEM 5.5 mM glucose + 4.5 mg/ml A1AT (control + A1AT), DMEM 30 mM glucose (diabetic), and DMEM 30 mM glucose + 4.5 mg/ml A1AT (diabetic + A1AT). Cells were harvested in RIPA buffer for Western blot or fixed for immunohistochemistry.

A1AT reduced the expression of Cx43, IRS-1 and AS160 and NFκB. Furthermore, it reduced AKT and pAKT1/2/3 expression levels, thus indicating the involvement of the PI3K/AKT pathway. This pathway is associated with insulin and Wnt signaling pathways. In turn, there was a reduction in iNOS and TNFα expression associated with the lower NFκB expression.

These results support the hypothesis postulating that A1AT modulates the expression of diverse proteins involved in the inflammatory response and others, which are essential for retinal function via insulin, PI3K/AKT and Wnt signaling pathways. All these results together evidence that A1AT is a promising molecule for the treatment of DR.

Alfa-1 antitripsina modula a expressão de proteínas inflamatórias e outras proteínas essenciais para a retina em células ARPE-19 com alta glicemia

A retinopatia diabética (RD) se encontra associada a inflamação persistente e ao dano no leito vascular. O tratamento atual se encontra focado nas etapas mais severas de esta doença. Os resultados prévios obtidos por nosso grupo, mostram que a Alfa-1 Antitripsina (A1AT) atua como um agente anti-inflamatório que poderia jogar um rol no tratamento da RD. De qualquer forma, é importante saber qual é o efeito do tratamento

com A1AT sobre outras proteínas relevantes para o normal funcionamento da retina e quais são os mecanismos moleculares envolvidos. O epitélio pigmentar da retina forma o componente epitelial da barreira hematorretiniana. A conexina43 (Cx43) é a proteína das uniões gap maiormente expressada em estas células. A sobre-expressão da Cx43 tem sido associada ao edema e a perda da integridade vascular. IRS-1 e AS160 se encontram envolvidos na via de sinalização da insulina e se vem afetados na diabetes. NFκB é um fator de transcrição chave nos processos inflamatórios e se encontra incrementado na RD.

Avaliamos a expressão de Cx43, IRS-1, AS160, NFκB e outras proteínas associadas a diferentes vias de sinalização em um modelo *in vitro* de RD.

Células ARPE-19 (ATCC® CRL-2302®, Manassas, Virginia, USA) se cultivaram em DMEM/F12 (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) com 2μM L-glutamina, 100 U/ml penicilina, 100 μg/ml estreptomicina e 10% SFB. As células (passagens 9 a 12) se incubaram 16h com DMEM 5,5 mM glucose (controle), DMEM 5,5 mM glucose + 4.5 mg/ml A1AT (control+A1AT), DMEM 30 mM glucose (diabéticas), DMEM 30 mM glucose + 4.5 mg/ml A1AT (diabéticas+A1AT). As células foram colhidas em buffer RIPA para *Western blot* ou fixadas para imunohistoquímica.

A A1AT diminuiu a expressão da Cx43, IRS-1 e AS160 e NFκB. Além disso, reduziu os níveis de expressão de AKT e pAKT1/2/3, indicando a participação da via PI3K/AKT. Esta via se encontra associada com as vias de sinalização da insulina e Wnt. A sua vez, associado à menor expressão de NFκB, se observou uma diminuição de expressão de iNOS e TNFα.

Estes resultados suportam a hipótese de que a A1AT modula a expressão de diversas proteínas envolvidas na resposta inflamatória e outras que são essenciais para o funcionamento da retina a través das vias de sinalização da insulina, PI3K/AKT e Wnt. Todos estes resultados em seu conjunto mostram à A1AT como uma molécula promissora para o tratamento da RD.

## La vía fosfolipasa D modula el proceso autofágico en las células del epitelio pigmentario de la retina expuestas a estrés inflamatorio

Bermúdez, Vicente; Tenconi, Paula E.; Giusto, Norma M.; Mateos, Melina V.

*Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca (INIBIBB), CONICET.*

*DBByF-Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina.*  
bermudez@inibibb-conicet.gob.ar

**Objetivos.** La autofagia es un proceso catabólico altamente activo en las células del epitelio pigmentario de la retina (EPR) y cuya desregulación se ha asociado a la patogénesis de diversas enfermedades degenerativas de la retina. Resultados previos de nuestro laboratorio demostraron la participación de las isoformas clásicas de la fosfolipasa D (PLD1 y PLD2) en la respuesta inflamatoria de las células del EPR. El objetivo del presente trabajo es caracterizar el proceso autofágico y su modulación por la vía PLD, en las células del EPR expuestas a un modelo inflamatorio inducido por lipopolisacárido (LPS).

**Métodos.** Células de EPR humanas (líneas D407 y ARPE-19) se expusieron a LPS (10 o 25 μg/ml) por 24 o 48 horas. Se realizaron ensayos de *Western blot* e inmunofluorescencia para evaluar el contenido de LC3II y SQSTM1/p62 (marcadores de autofagosomas) y la presencia de estructuras intracelulares punteadas p62- y LC3-positivas. Se utilizó bafilomicina A1 (BAF, 50 nM) para bloquear el flujo autofágico e inhibidores tempranos de la autofagia, 3-metiladenina (3-MA, 2 y 5 mM) y LY294002 (10 μM). El rol de la vía PLD se estudió utilizando inhibidores selectivos de PLD1 (VU0359595, 0.5 o 5 μM) o PLD2 (VU0285655-1, 0.5 o 5 μM). La viabilidad celular se evaluó por la técnica de reducción del MTT.

**Resultados.** El LPS indujo un aumento en los niveles de estrés oxidativo y en la activación del factor NFκB y una disminución de viabilidad de las células del EPR. Además, la exposición a LPS incrementó los niveles de LC3II y el contenido de estructuras punteadas LC3- y p62 positivas,



tanto en células D407 como en ARPE-19. El bloqueo del flujo autofágico con BAF corroboró que el LPS induce la activación de la autofagia en las células del epitelio. Por su parte, la inhibición de PLD1 y PLD2 incrementó los niveles de LC3II y el contenido de estructuras punteadas LC3- y p62- positivas inducidos por LPS. La inhibición de la autofagia con 3-MA y LY294002 empeoró la pérdida de viabilidad celular inducida por LPS mientras que los inhibidores de PLD1 y PLD2 previnieron la pérdida de viabilidad.

**Conclusiones.** Nuestros resultados demuestran que en condiciones inflamatorias se reduce la viabilidad celular y aumenta la autofagia en las células del EPR. Nuestros hallazgos sugieren que el proceso autofágico mediaría protección celular frente a una lesión inflamatoria y que ambas isoformas de PLD serían capaces de modular tal proceso.

**Financiamiento.** PICTs 2014-3352, 2013-2317.

The phospholipase D pathway modulates the autophagic process in retinal pigment epithelium cells exposed to inflammatory stress

**Objectives.** Autophagy is a highly active catabolic process in retinal pigment epithelium (RPE) cells, and its dysregulation has been associated with the pathogenesis of diverse retinal degenerative diseases. Previous results obtained in our laboratory demonstrated the involvement of the classical phospholipase D isoforms (PLD1 and PLD2) in the inflammatory response of RPE cells. The goal of this paper is to characterize the autophagic process and its modulation by the PLD pathway in RPE cells exposed to a lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory model.

**Methods.** Human RPE cells (D407 and ARPE-19 lines) were exposed to a LPS (10 or 25 µg/ml) for 24 to 48 hours. Western blot and immunofluorescence assays were performed to evaluate the LC3II and SQSTM1/p62 (autophagosome markers) content and for the presence of p62- and LC3-positive dot-like intracellular structures. Bafilomycin A1 (BAF, 50 nM) was used to block autophagic flow and early autophagy inhibitors, 3-methyladenine (3-MA, 2 and 5 mM) and LY294002 (10 µM). The role of the PLD pathway was studied with the use

of PLD1- (VU0359595, 0.5 or 5 µM) or PLD2-selective inhibitors (VU0285655-1, 0.5 or 5 µM). Cell viability was evaluated by the MTT reduction technique.

**Results.** The LPS induced an increase in the levels of oxidative stress and in NFκB factor activation, as well as a decrease in the viability of RPE cells. In addition, exposure to a LPS increased LC3II levels and the content of LC3- and p62-positive dots, both in D407 cells and in ARPE-19 cells. Autophagic flow blockade by BAF demonstrated that the LPS induces autophagy activation in epithelial cells. On the other hand, PLD1 and PLD2 inhibition increased LC3II levels and the content of LC3- and p62-positive dots induced by the LPS. Autophagy inhibition by 3-MA and LY294002 worsened the cell viability loss induced by the LPS while PLD1 and PLD2 inhibitors prevented viability loss.

**Conclusions.** Our results demonstrate that in RPE cells, cell viability is reduced and autophagy is increased in inflammatory conditions. Our findings suggest that the autophagic process acts as a mediator of cell protection in the presence of inflammatory damage and that both PLD isoforms are able to modulate this process.

**Funding.** PICTs 2014-3352, 2013-2317.

A via fosfolipase D modula o processo autofágico nas células do epitélio pigmentar da retina expostas a estresse inflamatório

**Objetivos.** A autofagia é um processo catabólico altamente ativo nas células do epitélio pigmentário da retina (EPR) e cuja desregulação tem se associado à patogênese de diversas doenças degenerativas da retina. Resultados prévios de nosso laboratório demonstraram a participação das isoformas clássicas da fosfolipase D (PLD1 y PLD2) na resposta inflamatória das células do EPR. O objetivo do presente trabalho é caracterizar o processo autofágico e sua modulação pela via PLD, nas células do EPR expostas a um modelo inflamatório induzido por lipopolissacarídeo (LPS).

**Métodos.** Células de EPR humanas (linhas D407 e ARPE-19) se expuseram a LPS (10 ou 25 µg/ml) por 24 ou 48 horas. Se realizaram ensaios

de *Western blot* e imunofluorescência para avaliar o conteúdo de LC3II e SQSTM1/p62 (marcadores de autofagossomas) e a presença de estruturas intracelulares ponteadas p62- e LC3-positivas. Utilizou-se bafilomicina A1 (BAF, 50 nM) para bloquear o fluxo autofágico e inibidores precoces da autofagia, 3-metiladenina (3-MA, 2 y 5 mM) e LY294002 (10 µM). O rol da via PLD se estudou utilizando inibidores seletivos de PLD1 (VU0359595, 0,5 o 5 µM) ou PLD2 (VU0285655-1, 0,5 o 5 µM). A viabilidade celular se avaliou pela técnica de redução do MTT.

**Resultados.** O LPS induziu um aumento nos níveis de estresse oxidativo e na ativação do fator NFκB e uma diminuição de viabilidade das células do EPR. Além disso, a exposição a LPS incrementou os níveis de LC3II e o conteúdo de estruturas tracejadas LC3- y p62 positivas, tanto em células D407 quanto em ARPE-19. O bloqueio do fluxo autofágico com BAF confirmou que o LPS induce a ativação da autofagia nas células do epitélio. Por sua parte, a inibição de PLD1 e PLD2 incrementou os níveis de LC3II e o conteúdo de estruturas tracejadas LC3- y p62- positivas inducidos por LPS. A inibição da autofagia con 3-MA e LY294002 piorou a perda de viabilidade celular induzida por LPS enquanto os inibidores de PLD1 e PLD2 preveniram a perda de viabilidade.

**Conclusões.** Nossos resultados demostram que em condições inflamatórias se reduce a viabilidade celular e aumenta a autofagia nas células do EPR. Nossos achados sugerem que o processo autofágico mediaría proteção celular frente a uma lesão inflamatória e que ambas as isoformas de PLD serían capaces de modular tal processo.

**Financiamento.** PICTs 2014-3352, 2013-2317.

## Esteroides y supervivencia de fotorreceptores

Marquioni Ramella, Melisa D.; Tate, Pablo; Marazita, Mariela; Suburo, Angela

Instituto de Investigaciones en Medicina Traslacional (IIMT), Universidad Austral-CONICET, Pilar, Buenos Aires, Argentina.

mmarquio@austral.edu.ar

La supervivencia de los fotorreceptores está afectada en diversas retinopatías de origen gené-

tico y en la degeneración macular asociada con la edad. Las hormonas esteroides tienen efectos neuroprotectores y varias evidencias sugieren que la progesterona (PROG) y la dexametasona (DEX) podrían mejorar la supervivencia de los fotorreceptores. A fin de comparar los mecanismos de neuroprotección dependientes de estos esteroides, estudiamos su efecto en dos modelos de degeneración de fotorreceptores en ratón: las lesiones fototóxicas y las inducidas por mifepristona (MFP).

Se emplearon ratones balb/c machos (5-7 semanas) criados bajo iluminación cíclica (12 horas luz-12 horas oscuridad; ≤ 60 lux). Para generar daño los animales se expusieron 48 horas a 1500 lux o recibieron una inyección de MFP (10 mg/kg). En cada modelo, los ratones recibieron tratamiento esteroide (DEX 4 mg/kg, PROG 1-4 mg/kg) durante dos días, mientras que los grupos controles recibieron solución salina. Los animales fueron sacrificados a los 2 días para la detección de diversos marcadores por *Western blot* (WB) o por inmunodetección *in situ*, o bien a los 7 días para determinar el espesor de la capa nuclear externa (CNE) como medida de la supervivencia de los fotorreceptores.

Las lesiones fueron semejantes en ambos modelos. La inmunohistoquímica para caspasa 3 clivada (CASP3) y la reacción TUNEL demostraron que sólo los núcleos de los fotorreceptores presentaban signos de muerte celular. Asimismo, los WB demostraron idénticos cambios en los marcadores de daño celular CASP3 y la histona H2AX fosforilada (p-H2AX). También fueron semejantes las modificaciones de las moléculas reguladoras de la muerte celular: BCL2, BCL-XL, BAX y BID, coherentes con un proceso de apoptosis. Solamente se detectaron diferencias en los niveles de opsina, reducidos por el exceso de iluminación pero no afectados por MFP. Todas las lesiones se controlaron por el tratamiento con DEX o PROG, de forma tal que a los 7 días las pérdidas de núcleos en la CNE eran mínimas y estadísticamente no significativas.

Concluimos que tanto PROG como DEX son neuroprotectores eficientes en las lesiones fototóxicas y las inducidas por MFP. Además,

estas últimas sugieren que la supervivencia de los fotorreceptores depende de estas hormonas esteroides.

*Fondos.* PICT 2013-3200 y subsidio rectorado Universidad Austral.

#### Steroids and photoreceptor survival

Photoreceptor survival is impaired in diverse retinopathies of genetic origin and in age-related macular degeneration. Steroid hormones have neuroprotective effects and there is plenty of evidence suggesting that progesterone (PROG) and dexamethasone (DEX) might improve photoreceptor survival. With the purpose of comparing the neuroprotective mechanisms of these steroids we studied their effect in two mice photoreceptor degeneration models: phototoxic damage and mifepristone (MFP)-induced injuries. Male balb/c mice (5-7 weeks) bred under cyclic illumination (exposed to 12 hours of light and 12 hours of dark;  $\leq 60$  lux) were used. Mice were exposed to 1500 lux for 48 hours or received an MFP injection (10 mg/kg) to produce damage. In each model, mice received steroid treatment (DEX 4 mg/kg, PROG 1-4 mg/kg) for two days, while control groups were administered saline. Animals were euthanized either at 2 days for the detection of different markers by Western blot (WB) or *in situ* immunodetection, or at 7 days to determine outer nuclear layer (ONL) thickness as a measure of photoreceptor survival.

Injuries were similar in both models. Immunohistochemistry for cleaved caspase 3 (CASP3) and TUNEL reaction revealed that only photoreceptor nuclei had signs of cell death. Moreover, WB evidenced identical changes in the cell damage markers CASP3 and phosphorylated histone H2AX (p-H2AX). Modifications in the cell death-regulating molecules BCL2, BCL-XL, BAX and BID were similar, consistently with the presence of an apoptotic process. Differences were only found in opsin levels, which were reduced by excess illumination but not affected by MFP. All injuries were controlled by DEX or PROG treatment, therefore, at 7 days, nuclei loss in the ONL was minimal and not statistically significant. Hence, it may be con-

cluded that both PROG and DEX are efficient neuroprotectors in MFP-induced phototoxic damage. Moreover, these observations suggest that photoreceptor survival depends on these steroid hormones.

*Funding.* PICT 2013-3200 and subsidy granted by the Rectorate of Universidad Austral.

#### Esteroides e supervivência de fotorreceptores

A supervivência dos fotorreceptores está afetada em diversas retinopatias de origem genética e na degeneração macular associada com a idade. Os hormônios esteroides tem efeitos neuroprotetores e várias evidências sugerem que a progesterona (PROG) e a dexametasona (DEX) poderiam melhorar a supervivência dos fotorreceptores. Com o fim de comparar os mecanismos de neuroproteção dependentes destes esteroides, estudamos seu efeito em dois modelos de degeneração de fotorreceptores em rato: as lesões fototóxicas e as induzidas por mifepristona (MFP).

Empregaram-se ratos balb/c macho (5-7 semanas) criados sob iluminação cíclica (12 horas luz-12 horas escuridão;  $\leq 60$  lux). Para gerar dano os animais se expuseram 48 horas a 1500 lux ou receberam uma injeção de MFP (10 mg/kg). Em cada modelo, os ratos receberam tratamento esteroide (DEX 4 mg/kg, PROG 1-4 mg/kg) durante dois dias, enquanto os grupos controles receberam solução salina. Os animais foram sacrificados aos 2 dias para a detecção de diversos marcadores por *Western blot* (WB) ou por imunodeteção *in situ*, ou aos 7 dias para determinar a espessura da camada nuclear externa (CNE) como medida da supervivência dos fotorreceptores.

As lesões foram semelhantes em ambos os modelos. A imunohistoquímica para caspase 3 clivada (CASP3) e a reação TUNEL demonstraram que apenas os núcleos dos fotorreceptores apresentavam signos de morte celular. Além disso, os WB demonstraram idênticas mudanças nos marcadores de dano celular CASP3 e a histona H2AX fosforilada (p-H2AX). Também foram semelhantes as modificações das moléculas reguladoras da morte celular: BCL2,

BCL-XL, BAX y BID, coherentes con um processo de apoptose. Apenas se detectaram diferenças nos níveis de opsina, reduzidos pelo excesso de iluminação, mas não afetados por MFP. Todas as lesões se controlaram pelo tratamento com DEX ou PROG, de forma tal que aos 7 dias as perdas de núcleos na CNE eram mínimas e estatisticamente não significativas.

Concluimos que tanto PROG quanto DEX são neuroprotetores eficientes nas lesões fototóxicas e as induzidas por MFP. Além disso, essas últimas sugerem que a supervivência dos fotorreceptores depende destes hormônios esteroides.

*Financiamento.* PICT 2013-3200 e subsídio Reitoria Universidade Austral.

---

27

---

### Parthanatos, una nueva vía activada por la ceramida para inducir la muerte de las neuronas fotorreceptoras

Prado Spalm FH, Vera MS, Dibo MJ, Simón MV, Politi LE, Rotstein NP

*Instituto de Investigaciones Bioquímicas, Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional del Sur-CONICET, Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina.*  
inrotste@criba.edu.ar

**Objetivos.** Las retinopatías neurodegenerativas tienen etiologías muy distintas, pero comparten un rasgo común: la muerte de los fotorreceptores (FR). La ceramida (Cer), un esfingolípido bioactivo, ha sido propuesta como mediadora clave en la activación de esta muerte. Establecer los mecanismos intracelulares activados por la Cer es de gran importancia para identificar posibles blancos para prevenir estas enfermedades, aún sin tratamientos efectivos. Investigamos aquí las vías intracelulares que activa la Cer para inducir esta muerte.

**Métodos.** Tratamos a cultivos neuronales puros de retina de rata con 10  $\mu$ M C<sub>2</sub>-acetil esfingosina (C<sub>2</sub>-Cer), análogo permeable de la Cer. Evaluamos el efecto de inhibidores de distintas proteasas y de PoliADP ribosa polimerasa 1 (PARP1) sobre la muerte de los FR, determinada con yoduro de propidio, MTT, TUNEL y fragmentación nuclear. Analizamos la funcionalidad mitocondrial con la sonda MitoTracker, la localización subcelular del factor inductor de apoptosis (AIF), la formación

de especies oxígeno reactivas (ROS) y de polímeros de poliADP ribosa (PAR).

**Resultados.** La exposición a C<sub>2</sub>-Cer aumentó rápidamente la formación de ROS e indujo la muerte selectiva de los FR a las 6 horas, lo que hizo disminuir su funcionalidad mitocondrial, pero sin modificar el número de células TUNEL-positivas. Un pan-inhibidor de caspasas no previno la muerte neuronal. C<sub>2</sub>-Cer aumentó la formación de polímeros PAR, sintetizados por PARP1, y la translocación de AIF desde la mitocondria al núcleo, mientras que la inhibición de PARP1 previno tal translocación y la muerte inducida por C<sub>2</sub>-Cer. Un inhibidor de calpaínas también redujo la muerte de los FR y la translocación de AIF. En contraste, inhibidores de catepsinas, de autofagia y de necrosis programada no disminuyeron la muerte de los FR.

**Conclusión.** Nuestros resultados sugieren que la C<sub>2</sub>-Cer activaría una vía novedosa, independiente de caspasas, denominada *parthanatos*. Esta vía involucra la sobreactivación de PARP1, que aumenta así la síntesis y unión de polímeros PAR a proteínas, la pérdida del potencial de membrana mitocondrial y la activación de calpaínas, procesos que llevan a la translocación nuclear de AIF y conducen a la inducción de la muerte de los FR.

Parthanatos, a novel ceramide-activated pathway to induce photoreceptor death

**Objectives.** Neurodegenerative retinopathies have very different etiologies, but they have a feature in common: photoreceptor (PR) death. Ceramide (Cer), a bioactive sphingolipid, has been suggested to be a key mediator in the activation of this death. Establishing the intracellular mechanisms activated by Cer is critical to identify possible targets for the prevention of these diseases even in the absence of effective therapies. Here we investigate the intracellular pathways activated by Cer to induce this death.

**Methods.** We treated pure neuronal cultures of rat retinas with 10  $\mu$ M C<sub>2</sub>-acetyl sphingosine (C<sub>2</sub>-Cer), a permeable Cer-analog. The effect of inhibitors of different proteases and polyADP ribosyl polymerase-1 (PARP-1) on PR death, as determined by propidium iodide, MTT, TUNEL and nuclear fragmentation, was evaluated. We

also analyzed mitochondrial functionality with the MitoTracker probe, the subcellular localization of the apoptosis-inducing factor (AIF), and the formation of reactive oxygen species (ROS) and polyADP-ribose (PAR) polymer.

**Results.** Exposure to C<sub>2</sub>-Cer increased ROS formation rapidly and induced selective PR death after 6 hours, with a consequent mitochondrial functionality impairment, but not modifying the number of TUNEL-positive cells. However, a pan-caspase inhibitor failed to prevent neuronal death. C<sub>2</sub>-Cer increased the formation of PAR polymers synthesized by PARP1 and AIF translocation from the mitochondrion to the nucleus, while PARP1 inhibition prevented such translocation as well as C<sub>2</sub>-Cer-induced death. A calpain inhibitor also reduced PR death and AIF translocation. In contrast, cathepsin, autophagy and programmed necrosis inhibitors did not reduce PR death.

**Conclusion.** Our results suggest that C<sub>2</sub>-Cer may activate a novel, caspase-independent pathway known as “parthanatos”. This pathway involves PARP1 overactivation, thus increasing PAR synthesis and protein binding, mitochondrial membrane potential loss and calpain activation, processes that lead to AIF nuclear translocation and to the induction of PR death.

Parthanatos, uma nova via ativada pela ceramida para induzir a morte dos neurônios fotorreceptoras

**Objetivos.** As retinopatias neurodegenerativas tem etiologias muito distintas, mas compartilham um rasgo comum: a morte dos fotorreceptores (FR). A ceramida (Cer), um esfingolípido bioativo, tem sido proposta como mediadora chave na ativação desta morte. Estabelecer os mecanismos intracelulares ativados pela Cer é de grande importância para identificar possíveis alvos para prevenir estas doenças, ainda sem tratamentos efetivos. Pesquisamos aqui as vias intracelulares que ativa a Cer para induzir essa morte.

**Métodos.** Tratamos culturas neuronais puras de retina de rato com 10 µM C<sub>2</sub>-acetil esfingosina (C<sub>2</sub>-Cer), análogo permeável da Cer. Avaliamos o efeito de inibidores de distintas proteasas e de PoliADP ribose polimerase 1 (PARP1) sobre a morte dos FR, determinada com iodeto de pro-

pídeo, MTT, TUNEL e fragmentação nuclear. Analisamos a funcionalidade mitocondrial com a sonda MitoTracker, a localização subcelular do fator indutor de apoptose (AIF), a formação de espécies oxigênio reativas (ROS) e de polímeros de poliADP ribose (PAR).

**Resultados.** A exposição a C<sub>2</sub>-Cer aumentou rapidamente a formação de ROS e induziu a morte seletiva dos FR as 6 horas, o que diminuiu sua funcionalidade mitocondrial, mas sem modificar o número de células TUNEL-positivas. Um pan-inibidor de caspases não previu a morte neuronal. C<sub>2</sub>-Cer aumentou a formação de polímeros PAR, sintetizados por PARP1, e a translocação de AIF desde a mitocôndria ao núcleo, enquanto a inibição de PARP1 preveniu aquela translocação e a morte induzida por C<sub>2</sub>-Cer. Um inibidor de calpaínas também reduziu a morte dos FR e a translocação de AIF. Em contraste, inibidores de catepsinas, de autofagia e de necrose programada não diminuíram a morte dos FR.

**Conclusão.** Nossos resultados sugerem que a C<sub>2</sub>-Cer ativaria uma nova via, independente de caspases, denominada *parthanatos*. Esta via envolve a sobreativação de PARP1, que aumenta a síntese e união de polímeros PAR a proteínas, a perda do potencial de membrana mitocondrial e a ativação de calpaínas, processos que levam à translocação nuclear de AIF e conduzem à indução da morte dos FR.

## Rapamicina: otra potencial estrategia terapéutica para modular la neovascularización retinal pero no la neurodegeneración

Subirada PV, Paz MC, Ridano ME, Vaglianti V, Barcelona PE, Chiabrando GA, Sánchez MC  
Departamento de Bioquímica Clínica, CIBICI-CONICET, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba.

Ante la diversidad de respuestas al tratamiento con antiangiogénicos y el complejo esquema de administración, en la actualidad se buscan nuevos blancos terapéuticos para las retinopatías neovasculares proliferativas. Los estudios recientes postulan a la rapamicina como una droga con gran potencial terapéutico por su acción inhibitoria sobre mTOR y en consecuencia sobre los niveles

de VEGF. Sin embargo, no se ha estudiado hasta el momento su efecto sobre viabilidad y funcionalidad neuronal. En patologías neurológicas se describió que la autofagia constituye un mecanismo de supervivencia al incrementar la depuración de proteínas y organelas dañadas, aunque su activación excesiva podría inducir muerte celular. En este trabajo nos propusimos determinar en el modelo de retinopatía inducida por oxígeno (OIR), los cambios vasculares, neuronales y bioquímicos retinales subyacentes a una inyección intraocular de rapamicina. Para este propósito, ratones C57/BL6 se expusieron a 75% de O<sub>2</sub> desde el día postnatal (P) 7 a 12, y luego fueron devueltos a condiciones ambientales (RA). Se usaron ratones de la misma edad mantenidos en RA como control. Los ratones recibieron una única inyección intraocular de rapamicina o PBS en P12 y se sacrificaron en P12, P17 y P26. Por *Western blot* e inmunomarcación de LC3 y P62 se corroboró el incremento en el flujo autofágico en P12. *Flatmounts* de retinas P17 teñidos con isolectina B4 evidenciaron que el tratamiento con rapamicina disminuyó el área neovascular pero no mejoró la zona avascular, vasodilatación y tortuosidad capilar. Los registros funcionales no mostraron mejoría en la funcionalidad retinal a P17 y P26, lo cual se correlacionó con idéntico número de células TUNEL positivas a ambos tiempos evaluados. En el mismo sentido, tampoco se observaron cambios significativos en los niveles de caspasa 3 total, proteínas de estrés (GFAP) y detoxificantes (GS). Estos estudios evidencian que la activación del flujo autofágico regula eventos de neovascularización sin lograr cambios en el componente neuronal y glial.

*Financiamiento.* SeCyT-UNC, FONCyT.

Rapamycin: another potential therapeutic strategy to modulate retinal neovascularization but not neurodegeneration

Due to the diversity of responses to antiangiogenic treatment and to the complex dosage regimen, new therapeutic targets for proliferative neovascular retinopathies are currently being sought. Recent studies postulate rapamycin as a drug with great therapeutic potential due to its inhibitory effect on mTOR, and consequently,

on VEGF levels. However, to date, its effect on neuronal viability and functionality has still not been studied. In neurologic diseases, it has been reported that autophagy is a survival mechanism since it increases depuration of proteins and damaged organelles, though excessive activation might induce cell death. The purpose of this paper was to determine retinal vascular, neuronal and biochemical changes underlying an intraocular rapamycin injection in an oxygen-induced retinopathy (OIR) model. Therefore, C57/BL6 mice were exposed to 75% of O<sub>2</sub> from postnatal day (PD) 7 to 12 and then they were returned to environmental conditions (EC). Mice of the same age were kept under EC as controls. Mice received a single intraocular injection of rapamycin or PBS on PD12 and they were euthanized on PD12, PD17 and PD26. Western blot and immunolabeling of LC3 and P62 demonstrated an increased autophagic flow on PD12. Isolectin B4-stained retinal flat-mounts evidenced that rapamycin treatment reduced the neovascular area but did not improve the avascular zone and capillary vasodilation and tortuosity. Functional records failed to show any improvement in retinal functionality on PD17 and PD26, which correlated with an identical number of TUNEL-positive cells at both time-points evaluated. Likewise, no significant changes were observed in the levels of total caspase 3, stress proteins (GFAP) and detoxifying (GS) proteins. These studies establish that autophagic flow activation regulates neovascularization events with no consequent changes in the neuronal and glial component.

*Funding.* SeCyT-UNC, FONCyT.

Rapamicina: outra potencial estratégia terapêutica para modular a neovascularização retiniana mas não a neurodegeneração

Frente à diversidade de respostas ao tratamento com antiangiogênicos e o complexo esquema de administração, na atualidade se procuram novos alvos terapêuticos para as retinopatias neovasculares proliferativas. Os estudos recentes postulam à rapamicina como uma droga com grande potencial terapêutico por sua ação inibitória sobre mTOR e em consequência sobre os níveis de VEGF. Porém, não tem se estudado até o momento seu

efeito sobre viabilidade e funcionalidade neuronal. Em patologias neurológicas se descreveu que a autofagia constitui um mecanismo de supervivência ao incrementar a depuração de proteínas e organelas danadas, embora sua ativação excessiva poderia induzir morte celular. Neste trabalho nos propusemos determinar o modelo de retinopatia induzida por oxigênio (OIR), as mudanças vasculares, neuronais e bioquímicas retiniais subjacentes a uma injeção intraocular de rapamicina. Para este propósito, ratos C57/BL6 foram expostos a 75% de O<sub>2</sub> desde o dia pós-natal (P) 7 a 12, e logo foram devolvidos a condições ambientais (RA). Usaram-se ratos da mesma idade mantidos em RA como controle. Os ratos receberam uma única injeção intraocular de rapamicina ou PBS em P12 e se sacrificaram em P12, P17 e P26. Por *Western blot* e imunomarcagem de LC3 e P62 se confirmou o incremento no fluxo autofágico em P12. *Flatmounts* de retinas P17 tingidos com isolectina B4 evidenciaram que com o tratamento com rapamicina diminuiu a área neovascular mas não melhorou a zona avascular, vasodilatação e tortuosidade capilar. Os registros funcionais não mostraram melhoria na funcionalidade da retina a P17 e P26, o qual se correlacionou com idêntico número de células TUNEL positivas a ambos os tempos avaliados. No mesmo sentido, também não se observaram mudanças significativas nos níveis de caspase 3 total, proteínas de estresse (GFAP) e detoxificantes (GS). Estes estudos evidenciam que a ativação do fluxo autofágico regula eventos de neovascularização sem conseguir mudanças no componente neuronal e glial.

*Financiamento.* SeCyT-UNC, FONCyT.

## Efectos retinales en el daño del nervio óptico inducido por neuritis óptica experimental

Altschuler, Florencia; González Fleitas, María F.; Chianelli, Mónica S.; Sande, Pablo H.; Dorfman, Damián; Rosenstein, Ruth E.; Aranda, Marcos L.

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

*Introducción.* La neuritis óptica (NO) es una afección que involucra inflamación pri-

maria, desmielinización y lesión axonal en el nervio óptico que puede provocar ceguera. Un subconjunto de células ganglionares retinales (CGR) que expresa el fotorpigmento melanopsina (mCGR) regula las funciones visuales del sistema no formador de imagen, como el reflejo pupilar (RP) y los ritmos circadianos.

*Objetivo.* Analizar las consecuencias de la neuritis óptica sobre la retina.

*Métodos.* Recientemente desarrollamos un modelo experimental de NO primaria en ratas a través de una microinyección del lipopolisacárido bacteriano (LPS) en el nervio óptico de ratas *Wistar* macho adultas.

*Resultados.* A los 4 días pos-LPS se observó un aumento en el área Iba-1 (+) retinal (un marcador de microglía/macrófagos) que persistió hasta los 21 días después de la inyección, mientras que la inmunorreactividad para GFAP (astrocitos y procesos de células de Müller) aumentó 21 días después de LPS. Además, a los 21 días postinyección, el LPS indujo una pérdida significativa del número de CGR (por inmunorreactividad contra Brn3a), mientras que no se observaron cambios en el número de mCGR. Además, la NO experimental indujo una disminución en el transporte anterógrado desde la retina al colículo superior y al núcleo supraquiasmático (mediante la inyección intravítrea de CTB) y una disminución en el RP evocado con luz blanca y azul.

*Conclusión.* Estos resultados sugieren que la NO experimental afecta la retina incluso en etapas tempranas y, si bien no indujo cambios en el número de mCGR, alteró el sistema visual no formador de imagen, apoyando que las alteraciones de la fisiología circadiana podrían ser un riesgo para la calidad de vida de los pacientes con NO.

Retinal effects in experimental optic neuritis-induced optic nerve damage

*Introduction.* Optic neuritis (ON) is a disease involving primary inflammation, demyelination and axonal injury in the optic nerve that can cause blindness. A subset of retinal ganglion cells (RGC) expressing the photopigment mela-

nopsin (mRGC) regulates the visual functions of the non-image forming system such as the pupillary reflex (PR) and circadian rhythms.

**Objective.** To analyze the consequences of ON on the retina.

**Methods.** Recently, we have developed and experimental model of primary ON in rats by means of a bacterial micropolysaccharide (LPS) microinjection into the optic nerve of adult male Wistar rats.

**Results.** Four days after the LPS injection there was an increase in the Iba-1(+) (a microglia/macrophage marker) retinal area that persisted up to 21 days after the injection, while GFAP (astrocytes and Müller glial cell processes) immunoreactivity increased 21 days after LPS administration. Furthermore, on day 21 post-LPS a significant loss in the number of RGC (by brn3a-immunoreactivity) was observed, while no changes in the number of mRGC were found. In addition, experimental ON induced a decrease in the anterograde transport from the retina to the superior colliculus (SC) and suprachiasmatic nucleus (by an intravitreal CTB injection) and a reduction in the PR evoked by exposure to white and blue light.

**Conclusion.** These results suggest that experimental ON affects the retina even at early stages, and, though it did not induce changes in the number of mRGC, it altered the non-image forming visual system, thus supporting that changes in the circadian physiology might be a risk for the quality of life of ON patients.

Efeitos na retina no dano do nervo óptico induzido por neurite óptica experimental

**Introdução.** A neurite óptica (NO) é uma afecção que envolve inflamação primária, desmielinização e lesão axonal no nervo óptico que pode provocar cegueira. Um subconjunto de células ganglionares retinianas (CGR) que expressa o fotopigmento melanopsina (mCGR) regula as funções visuais do sistema não formador de imagem, como o reflexo pupilar (RP) e os ritmos circadianos.

**Objetivo.** Analisar as consequências da neurite óptica sobre a retina.

**Métodos.** Recentemente desenvolvemos um modelo experimental de NO primária em ratos através de uma microinjeção do lipopolissacárido bacteriano (LPS) no nervo óptico de rato *Wistar* macho adultos.

**Resultados.** Aos quatro dias pós-LPS se observou um aumento na área Iba-1 (+) da retina (um marcador de microglia/macrófagos) que persistiu até os 21 dias depois da injeção, enquanto a imunorreatividade para GFAP (astrócitos e processos de células de Müller) aumentou 21 dias depois de LPS. Além disso, aos 21 dias pós-injeção, o LPS induziu uma perda significativa do número de CGR (por imunorreatividade contra Brn3a), enquanto não se observaram mudanças no número de mCGR. Além disso, a NO experimental induziu uma diminuição no transporte anterógrado desde a retina até o colículo superior e a núcleo supraquiasmático (através de a injeção intravítrea de CTB) e uma diminuição no RP evocado com luz branca e azul.

**Conclusão.** Estes resultados sugerem que a NO experimental afeta a retina inclusive em etapas precoces e, embora não tenha induzido mudanças no número de mCGR, alterou o sistema visual não formador de imagem, apoiando que as alterações da fisiologia circadiana poderiam ser um risco para a qualidade de vida dos pacientes com NO.

## Esfingosina-1-fosfato: ¿un nuevo mediador en la migración de las células epiteliales de la retina en la retinopatía diabética?

Simón MV, Vera MS, Prado Spalm FH, Rotstein NP.  
*Instituto de Investigaciones Bioquímicas, Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional del Sur-CONICET, Bahía Blanca, Argentina.*  
mvsimon@criba.edu.ar

**Objetivos.** Las enfermedades proliferativas de la retina —como lo es la retinopatía diabética— son causa frecuente de ceguera. Se caracterizan por la excesiva proliferación y migración de dos tipos celulares esenciales para el normal funcionamiento de la retina: las células gliales de Müller (CGM) y el epitelio pigmentario de la retina (EPR). Demostramos que la esfingosina-



na-1-fosfato (S1P), un esfingolípido bioactivo, aumenta la migración de las CGM. Investigamos ahora si la S1P induce la migración de células del EPR y si lo hace en un modelo *in vitro* de retinopatía diabética.

**Métodos.** Cultivos confluentes de ARPE19, línea de EPR humano, se suplementaron con S1P 5  $\mu$ M por 24 horas y la migración se analizó por el ensayo de cicatriz. Para evaluar si la S1P activa las vías ERK/MAPK, PI3K y/o p38 MAPK para inducir la migración celular, los cultivos fueron preincubados con U0126, Ly294002 o SB203580, antagonistas respectivos de tales vías. Para determinar si la S1P activa al receptor de membrana S1P3, reconocido partícipe de la migración celular, los cultivos se preincubaron con su antagonista BML241; y para evaluar si la síntesis endógena de S1P, catalizada por la esfingosina quinasa 1 (SphK1), es requerida para inducir la migración, con SphK12, inhibidor de SphK1. Para indagar el rol de la S1P en la migración epitelial en la retinopatía diabética, las ARPE19 se incubaron 48 horas con alta glucosa (30 mM).

**Resultados.** El agregado de S1P estimuló la migración de ARPE19. Tal migración se inhibió con la preincubación con BML241 y con Ly294002, U0126 y SB 203580, lo que sugiere que la S1P induce la migración del EPR a través de la activación del S1P3 y de las vías ERK/MAPK, PI3K y p38 MAPK. La preincubación con SphK12 redujo la migración, que sólo se recuperó parcialmente con el agregado de S1P, indicando que la síntesis endógena de S1P es crucial para promover la migración celular y la S1P exógena estimularía tal síntesis. La alta glucosa estimuló la migración de las ARPE19 y la inhibición de la síntesis de S1P frenó esa migración, lo que sugiere que la S1P endógena regularía la motilidad celular estimulada por la alta glucosa.

**Conclusiones.** Estos hallazgos permiten proponer un rol clave para el eje S1P/SphK1/S1P3 en la migración de las células gliales y epiteliales de la retina, exacerbada en la retinopatía diabética, y sugieren que la regulación de este eje constituiría un nuevo blanco terapéutico para el tratamiento de esta enfermedad.

**Financiación.** Subsidios de SECyT, UNS; CONICET y FONCYT.

Sphingosine-1-phosphate: a novel mediator in retinal pigment epithelium cell migration from the retina during diabetic retinopathy?

**Objectives.** Proliferative retinal diseases — such as diabetic retinopathy— are a common cause of blindness. These diseases are characterized by excess proliferation and migration of two types of cells that are essential to normal retinal function: Müller glial cells (MGC) and retinal pigment epithelium (RPE) cells. Here we demonstrate that sphingosine-1-phosphate (S1P), a bioactive sphingolipid, increases MGC migration. This paper investigates if S1P induces RPE cell migration and if it does in an *in vitro* diabetic retinopathy model.

**Methods.** Confluent cultures of ARPE19, a human RPE cell line, were supplemented with S1P 5  $\mu$ M for 24 hours and migration was analyzed by scar assays. For the purpose of evaluating if S1P activates the ERK/MAPK, PI3K and/or p38 MAPK pathways to induce cell migration, cultures were preincubated with U0126, Ly294002 or SB203580, antagonist of these pathways, respectively. In order to determine if S1P activates the membrane receptor S1P3, known as a receptor involved in cell migration, cultures were preincubated with its antagonist BML241, while to evaluate if S1P endogenous synthesis, catalyzed by sphingosine kinase 1 (SphK1), is required to induce migration, they were incubated with the SphK1 inhibitor, SphK12. With the purpose of elucidating the role of S1P in epithelial migration in diabetic retinopathy, ARPE19 cells were incubated with high glucose (30 mM) for 48 hours.

**Results.** Addition of S1P stimulated ARPE19 migration. This migration was inhibited by preincubation with BML241 and with Ly294002, U0126 and SB 203580, thus suggesting that S1P induces RPE cell migration via activation of the S1P3 pathway and the ERK/MAPK, PI3K and p38 MAPK pathways. Preincubation with SphK12 reduced migration, which was only restored partially by the addition of S1P, thus

suggesting that S1P endogenous synthesis is crucial to promote cell migration, and exogenous S1P is thought to stimulate this synthesis. High glucose stimulated ARPE19 cell migration and S1P synthesis inhibition stopped this migration, therefore, endogenous S1P might regulate high glucose-induced cell motility.

**Conclusions.** These findings have led us to propose that the S1P/SphK1/S1P3 axis may have a key role in the migration of glial and retinal pigment epithelium cells, which is exacerbated by diabetic retinopathy, and suggest that regulation of this axis may emerge as a new therapeutic target for the treatment of this disease.

**Funding.** SECyT, UNS; CONICET and FONCYT grants.

Esfingosina-1-fosfato: um novo mediador na migração das células epiteliais da retina na retinopatia diabética?

**Objetivos.** As doenças proliferativas da retina —como a retinopatia diabética— são causa frequente de cegueira. Caracterizam-se pela excessiva proliferação e migração de dois tipos celulares essenciais para o normal funcionamento da retina: as células gliais de Müller (CGM) e o epitélio pigmentário da retina (EPR). Demostramos que a esfingosina-1-fosfato (S1P), um esfingolípido bioativo, aumenta a migração das CGM. Pesquisamos agora se a S1P induz a migração de células do EPR e se isso acontece em um modelo *in vitro* de retinopatia diabética.

**Métodos.** Culturas confluentes de ARPE19, linha de EPR humano, se suplementaram com S1P 5  $\mu$ M por 24 horas e a migração se analisou pelo ensaio de cicatriz. Para avaliar se a S1P ativa as vias ERK/MAPK, PI3K e/ou p38 MAPK para induzir a migração celular, as culturas foram pré-incubadas com U0126, Ly294002 ou SB203580, antagonistas respetivos dessas vias. Para determinar se a S1P ativa ao receptor de membrana S1P3, reconhecido participante da migração celular, as culturas se pré-incubaram com seu antagonista BML241; e para avaliar se a síntese endógena de S1P, catalisada pela esfingosina quinase 1 (SphK1), é requerida para induzir a migração, com SphKI2, inibidor de SphK1. Para indagar o papel da S1P na migração

epitelial na retinopatia diabética, as ARPE19 se incubaram 48 horas com alta glucose (30 mM).

**Resultados.** O adicionamento de S1P estimulou a migração de ARPE19. Essa migração foi inibida com a pré-incubação com BML241 e com Ly294002, U0126 e SB 203580; isso sugere que a S1P induz a migração do EPR através da ativação do S1P3 e das vias ERK/MAPK, PI3K e p38 MAPK. A pré-incubação com SphKI2 reduziu a migração, que apenas se recuperou parcialmente com a adição de S1P, indicando que a síntese endógena de S1P é crucial para promover a migração celular e a S1P exógena estimularia essa síntese. A alta glucose estimulou a migração das ARPE19 e a inibição da síntese de S1P parou essa migração, isso sugere que a S1P endógena regularia a motilidade celular estimulada pela alta glucose.

**Conclusões.** Estes achados permitem propor um papel chave para o eixo S1P/SphK1/S1P3 na migração das células gliais e epiteliais da retina, exacerbada na retinopatia diabética, e sugerem que a regulação deste eixo constituiria um novo alvo terapêutico para o tratamento desta doença.

**Financiamento.** Subsídios de SECyT, UNS; CONICET e FONCYT.

## Validación de un modelo de ratón de neovascularización coroidea (CNV) inducida por láser

Barcelona PF<sup>a</sup>, Subirada PV<sup>a</sup>, Sabbi TN<sup>b</sup>, Márquez MA<sup>b</sup>, Vaglianti MV<sup>a</sup>, Ridano ME<sup>a</sup>, Márquez GE<sup>b</sup>, Paz MP<sup>a</sup>, Luna JD<sup>b</sup>, Sánchez MC<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba. CIBICI-CONICET, Córdoba, Argentina.

<sup>b</sup> Departamento de Vítreo-Retina, Centro Privado de Ojos Romagosa, Fundación VER, Córdoba, Argentina.

**Introducción.** La degeneración macular relacionada con la edad (DMAE) en su forma neovascular es una de las principales causas de pérdida de la visión en adultos mayores de 55 años. En este estudio validamos un procedimiento establecido para la inducción de la neovascularización coroidea (CNV, *por sus siglas en inglés*) en ratones. Este procedimiento consiste en la perforación de la membrana de Bruch mediante

fotocoagulación inducida por láser, reproduciendo la forma neovascular de DMAE.

**Objetivo.** Caracterizar el proceso neovascular y su impacto en la funcionalidad retinal así como su perfil inflamatorio. Los trabajos previos realizados en nuestro laboratorio demostraron que tanto  $\alpha 2M$  y su receptor (LRP1) participan durante la neovascularización retinal, por lo que también nos centramos en la participación del sistema  $\alpha 2M$ /LRP1.

**Métodos.** A ratones C57BL/6, 3-6 meses de edad, previamente anestesiados, se les practicaron cuatro lesiones de fotocoagulación por ojo con un láser de argón verde. Después de 7 días de realizadas las quemaduras por láser, analizamos las lesiones de neovascularización en *flatmount* de coroides-EPR mediante tinción con isolectina B4 utilizando microscopía confocal. Al mismo tiempo, mediante inmunotinción de marcadores específicos se caracterizaron las diferentes poblaciones celulares localizadas en el área de la lesión: CD105 (célula endotelial), NG2 (pericitos), F4/80 (microglía), así como la distribución del receptor LRP1 en estas células. Además, los niveles de proteína de  $\alpha 2M$  y LRP1 se analizaron por ensayos de WB y el perfil inflamatorio, evaluado por los niveles de IL1 $\beta$ , IL6 y TNF $\alpha$  mediante ensayo de qPCR. La funcionalidad de la retina se evaluó mediante ERG escotópico.

**Resultados.** Pudimos estandarizar el tamaño de la lesión. Se observó una cantidad importante de célula endotelial y pericitos alrededor de la lesión. Las células de la microglía se localizaron en el área central y periférica de la lesión, mientras que  $\alpha 2M$  y LRP1 mostraron un aumento en el nivel de proteína acompañado de un gran patrón de expresión en células cercanas a la lesión; como así también se evidenciaron altos niveles de factores proinflamatorios y proangiogénicos. Las ondas a y b de ERG escotópico se redujeron ( $p < 0,05$ ) en los ojos de animal con la lesión CNV respecto de los que no recibieron el tratamiento con láser.

**Conclusiones.** Pudimos reproducir y validar el modelo CNV en nuestro laboratorio, que nos brinda la posibilidad de evaluar la participación del sistema  $\alpha 2M$ /LRP1.

**Financiación.** SeCyT-UNC 2017, FoNCyT 2015, FoNCyT 2016.

Validation of a laser-induced choroidal neovascularization (CNV) mouse model

**Introduction.** Age-related macular degeneration (AMD) in its neovascular form is one of the leading causes of visual loss in adults over 55 years of age. In this study we validate an established procedure for induction of choroidal neovascularization (CNV) in mice. This procedure involves perforation of Bruch's membrane using laser-induced photocoagulation to reproduce neovascular AMD.

**Objective.** Our goal was to characterize the neovascular process and its impact on retinal function, as well as its inflammatory profile. Previous investigations carried out in our laboratory demonstrated that both  $\alpha 2M$  and its receptor (LRP1) are involved in retinal neovascularization and, therefore, we also focused on the involvement of the  $\alpha 2M$ /LRP1 system.

**Methods.** With the use of an argon green laser we induced four photocoagulation injuries in one eye of C57BL/6 previously anesthetized mice aged 3-6 months. After 7 days of laser-induced burns, we analyzed neovascularization injuries in choroid/RPE flat-mounts using Isolectin B4 staining and confocal microscopy. In addition, immunostaining of specific markers was used to characterize the different cell populations located in the area of the injury: CD105 (endothelial cell), NG2 (pericytes), F4/80 (microglia), as well as distribution of the LRP1 receptor in these cells. Moreover,  $\alpha 2M$  and LRP1 protein levels were analyzed by WB assays, while the inflammatory profile was evaluated based on IL1 $\beta$ , IL6 and TNF $\alpha$  levels using qPCR assays. Retinal function was assessed by scotopic ERG.

**Results.** We were able to standardize the injury's size. A significant amount of endothelial cell and pericytes were observed around the injury. Microglial cells were located in the central and peripheral areas of the injury, while  $\alpha 2M$  and LRP1 showed a rise in protein levels associated with a great expression pattern in cells located close to the injury. High levels of proinflamma-

tory and proangiogenic factors were also found. A- and b-waves of scotopic ERG were reduced ( $p < 0.05$ ) in eyes of animals with CNV injuries as compared to nonlasered ones.

**Conclusions.** We succeeded in reproducing and validating the CNV model in our laboratory, thus affording us the opportunity to evaluate  $\alpha 2M$ /LRP1 involvement.

**Funding.** SeCyT-UNC 2017, FoNCyT 2015, FoNCyT 2016.

Validação de um modelo de rato de neovascularização coroidal (CNV) induzida por laser

**Introdução.** A degeneração macular relacionada com a idade (DMRI) em sua forma neovascular é uma das principais causas de perda da visão em adultos maiores de 55 anos. Neste estudo validamos um procedimento estabelecido para a indução da neovascularização coroidal (CNV, por suas siglas em inglês) em ratos. Este procedimento consiste na peroração da membrana de Bruch por meio de fotocoagulação induzida por laser, reproduzindo a forma neovascular de DMRI.

**Objetivo.** Caracterizar o processo neovascular e seu impacto na funcionalidade da retina assim como seu perfil inflamatório. Os trabalhos prévios realizados em nosso laboratório demonstraram que  $\alpha 2M$  e seu receptor (LRP1) participam durante a neovascularização da retina, pelo qual também nos centramos na participação do sistema  $\alpha 2M$ /LRP1.

**Métodos.** A ratos C57BL/6, 3-6 meses de idade, previamente anestesiados, realizaram-se lhes quatro lesões de fotocoagulação por olho com um laser de argon verde. Depois de 7 dias de realizadas as queimaduras por laser, analisamos as lesões de neovascularização em *flat-mount* de coroides-EPR através de tinção com isolectina B4 utilizando microscopia confocal. Ao mesmo tempo, por meio de imunotinção de marcadores específicos se caracterizaram as diferentes populações celulares localizadas na área da lesão: CD105 (célula endotelial), NG2 (pericitos), F4/80 (microglia), tanto como a distribuição do receptor LRP1 nestas células. Adicionalmente, os níveis de proteína de  $\alpha 2M$  e

LRP1 se analisaram por ensaios de WB e o perfil inflamatório, avaliado pelos níveis de IL1 $\beta$ , IL6 e TNF $\alpha$  através de ensaio de qPCR. A funcionalidade da retina se avaliou por meio de ERG escotópico.

**Resultados.** Conseguimos estandarizar o tamanho da lesão. Observou-se uma quantidade importante de célula endotelial e pericitos ao redor da lesão. As células da microglia localizaram-se na área central e periférica da lesão, enquanto  $\alpha 2M$  e LRP1 mostraram um aumento no nível de proteína acompanhado de um grande padrão de expressão em células próximas à lesão; como também se evidenciaram altos níveis de fatores pró-inflamatórios e pró-angiogênicos. As ondas a e b de ERG escotópico se reduziram ( $p < 0,05$ ) nos olhos de animal com a lesão CNV respeito dos que não receberam o tratamento com laser.

**Conclusões.** Conseguimos reproduzir e validar o modelo CNV em nosso laboratório, que nos proporciona a possibilidade de avaliar a participação do sistema  $\alpha 2M$ /LRP1.

**Financiamento.** SeCyT-UNC 2017, FoNCyT 2015, FoNCyT 2016.

## Efecto protector de componentes bioactivos de la yerba mate sobre las lesiones de la retina provocadas por daño oxidativo

Tate, Pablo S.; Marazita, Mariela C.; Marquioni Ramella, Melisa D.; Suburo, Angela M.

Instituto de Investigaciones en Medicina Traslacional IIMT-CONICET, Universidad Austral, Pilar, Buenos Aires, Argentina.

**Objetivos.** La degeneración macular asociada con la edad (DMAE) es una enfermedad progresiva que lleva a la pérdida irreversible de la visión. Se postula que la senescencia celular prematura del epitelio pigmentario de la retina (EPR) podría jugar un papel principal en su etiopatogénesis. El estrés oxidativo es un inductor conocido de senescencia celular y tiene un papel principal en la progresión de la DMAE. Los polifenoles, micronutrientes presentes en la dieta, son capaces de dar protección frente a enfermedades degenerativas, previniendo el estrés oxidativo. La yerba mate es una importante fuente

de polifenoles en nuestro país, siendo los ácidos cafeico (CAF) y clorogénico (CHL) dos de los más abundantes. El objetivo de este trabajo es estudiar el rol CAF y CHL en la protección frente a la degeneración del epitelio pigmentario de la retina inducida por estrés oxidativo.

**Métodos.** Células ARPE-19 se trataron con ácido cafeico (70  $\mu\text{M}$ ) o ácido clorogénico (100  $\mu\text{M}$ ) durante 2 horas y luego expuestas a  $\text{H}_2\text{O}_2$  (150  $\mu\text{M}$ ) por 90 minutos. Se tomaron muestras a distintos tiempos luego del tratamiento y se evaluaron los niveles de p-CREB, Bcl-2 y  $\gamma\text{H2AX}$  por *Western blot*. Los niveles de ARNm de NRF2 y SOD2, genes involucrados en la respuesta al estrés oxidativo, se evaluaron por qPCR.

**Resultados.** CAF y CHL aumentaron los niveles de p-CREB y Bcl-2 ( $p < 0,5$ ) a 2 y 4 horas luego del tratamiento. Este incremento fue aún más evidente cuando las células se expusieron a daño oxidativo, donde además se redujo la fosforilación de la histona  $\gamma\text{H2AX}$  en células tratadas. Ambos compuestos incrementaron los niveles de ARNm para NRF2 y SOD2 a las 2 y 4 horas luego de la exposición.

**Conclusiones.** Los polifenoles presentes en la yerba mate protegen del daño oxidativo aumentando la defensa antioxidante y los genes de supervivencia. Estos resultados sugieren que la yerba mate podría actuar como un importante nutraceutico en la prevención de la DMAE.

Protective effect of bioactive compounds of *yerba mate* on oxidative stress-induced retinal injuries

**Objectives.** Age-related macular degeneration (ARMD) is a progressive disease leading to irreversible visual loss. We postulate that early cellular senescence of the retinal pigment epithelium (RPE) might play a major role in its etiopathogenesis. Oxidative stress is a known inducer of cellular senescence and has a major role in ARMD progression. Polyphenols, micronutrients that are present in our diet, are capable of providing protection against degenerative diseases by preventing oxidative stress. Yerba mate is an important source of polyphenols in our country, with caffeic (CAF) and chlorogenic (CHL) acids as two of the most abundant ones.

The goal of this paper is to study the role of CAF and CHL in protecting against oxidative stress-induced RPE degeneration.

**Methods.** ARPE-19 cells were treated with CAF (70  $\mu\text{M}$ ) or CHL (100  $\mu\text{M}$ ) for 2 hours and then exposed to  $\text{H}_2\text{O}_2$  (150  $\mu\text{M}$ ) for 90 minutes. Samples were collected at different time-points after treatment, and p-CREB, Bcl-2 and  $\gamma\text{H2AX}$  levels were evaluated by Western blot. Messenger RNA (mRNA) levels of NRF2 and SOD2, genes involved in the response to oxidative stress, were evaluated by qPCR.

**Results.** CAF and CHL increased p-CREB and Bcl-2 ( $p < 0.5$ ) levels 2 and 4 hours after treatment. This increase was even more evident when cells were exposed to oxidative damage, when, in addition, phosphorylated histone  $\gamma\text{H2AX}$  was reduced in treated cells. Both compounds increased NRF2 and SOD2 mRNA levels 2 and 4 hours after exposure.

**Conclusions.** Polyphenols present in yerba mate protect against oxidative damage by increasing antioxidant defense and survival genes. These results suggest that yerba mate may act as an important nutraceutic in ARMD prevention.

Efeito protetor de elementos bioativos da *yerba mate* sobre as lesões da retina provocadas por dano oxidativo

**Objetivos.** A degeneração macular associada com a idade (DMAI) é uma doença progressiva que leva à perda irreversível da visão. Postula-se que a senescência celular prematura do epitélio pigmentar da retina (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 DMAI. Os polifenóis, micronutrientes presentes na dieta, são capazes de dar proteção frente a doenças degenerativas, prevenindo o estresse oxidativo. A *yerba mate* é uma importante fonte de polifenóis em nosso país, sendo os ácidos cafeico (CAF) e clorogênico (CHL) dois dos mais abundantes. O objetivo deste trabalho é estudar o papel CAF e CHL na proteção frente à degeneração do epitélio pigmentar da retina induzida por estresse oxidativo.

**Métodos.** Células ARPE-19 foram tratadas com ácido cafeico (70  $\mu$ M) ou ácido clorogênico (100  $\mu$ M) durante 2 horas e logo expostas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (150  $\mu$ M) por 90 minutos. Tomaram-se amostras a distintos tempos logo do tratamento e se avaliaram os níveis de p-CREB, Bcl-2 e  $\gamma$ H2AX por *Western blot*. Os níveis de ARNm de NRF2 e SOD2, genes envolvidos na resposta ao estresse oxidativo, se avaliaram por qPCR.

**Resultados.** CAF e CHL aumentaram os níveis de p-CREB e Bcl-2 ( $p < 0,5$ ) a 2 e 4 horas logo do tratamento. Este incremento foi ainda mais evidente quando as células se expuseram a dano oxidativo, onde também se reduziu a fosforilação da histona  $\gamma$ H2AX em células tratadas. Ambos os compostos incrementaram os níveis de ARNm para NRF2 e SOD2 às 2 e 4 horas logo da exposição.

**Conclusões.** Os polifenóis presentes na *yerba mate* protegem do dano oxidativo aumentando a defesa antioxidante e os genes de supervivência. Estes resultados sugerem que a *yerba mate* poderia atuar como um importante nutracéutico na prevenção da DMAI.

20 minutos y se registró el electroretinograma (ERG). Se reclutaron 161 ojos caninos.

**Resultados.** Del total de ojos examinados, 69 presentaron alteraciones en el ERG (disminución de la amplitud de las ondas a y b y aumento de la latencia), de los cuales 59 no contrajeron las pupilas en respuesta a luz roja y 22 no respondieron a luz blanca. Los 92 ojos restantes presentaron un ERG normal, de los cuales 81 respondieron a la iluminación con luz roja y 84 a luz blanca.

**Conclusión.** La determinación del reflejo pupilar evocado por luz roja tuvo una sensibilidad del 88% en el diagnóstico de alteraciones retinales para el estudio pre-quirúrgico de cataratas caninas. Si bien este método diagnóstico no reemplaza al ERG, es rápido, sencillo, no requiere de sedación ni anestesia, es de fácil interpretación y de bajo costo operativo, y por lo tanto podría constituir un método predictivo relevante en la práctica oftalmológica veterinaria.

Detection of retinal changes through the evaluation of red light-evoked pupillary reflex in canines with cataracts

## DetECCIÓN DE ALTERACIONES EN LA RETINA A TRAVÉS DE LA EVALUACIÓN DEL REFLEJO PUPILAR EVOCADO POR LUZ ROJA EN CANINOS CON CATARATAS

Iaquinandí Murtagh A<sup>a</sup>, Reyes H<sup>b</sup>, López Martínez L<sup>c</sup>, Sande Casal P<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratorio de Neuroquímica Retiniana y Oftalmología Experimental, CEFyBO, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

<sup>b</sup> Clínica Oftalmológica Veterinaria Bucaramanga, Colombia.

<sup>c</sup> Centro Oftalmológico Veterinario La Estación.

**Objetivo.** El objetivo de nuestro trabajo fue determinar la eficiencia del diagnóstico pre-quirúrgico de alteraciones de la retina a través de la evaluación del reflejo pupilar evocado por luz roja en caninos con cataratas, en comparación con el registro electroretinográfico.

**Métodos.** En un ambiente oscuro se adaptó al paciente durante 5 minutos y se iluminó el ojo con luz roja; se repitió la adaptación y se iluminó con luz blanca. En ambos casos, se evaluó cualitativamente el tamaño de la pupila en el ojo ipsilateral. Luego se adaptó al animal durante

**Objective.** The purpose of this paper was to determine the efficiency of preoperative diagnosis of retinal changes by means of red light-evoked pupillary reflex in canines with cataracts, as compared to electroretinographic records.

**Methods.** The patient was adapted in a dark environment for 5 minutes, after which the eye was illuminated with red light; adaptation was then repeated but it was followed by white lighting. In both cases, pupil size of the ipsilateral eye was evaluated qualitatively. After this, the animal was kept in a dark room for 20 minutes for adaptation and electroretinography (ERG) was performed. A total of 161 eyes from canines were studied.

**Results.** Of the total eyes examined, 69 had disorders detected by ERG (reduction in the amplitude of a- and b-waves and increased latency), of which 59 had no pupil contraction in response to red light and 22 failed to have a response to white light. The 92 remaining eyes

had normal ERG, of which 81 responded to red light and 84 to white light.

**Conclusion.** Red light-evoked pupillary reflex had a sensitivity of 88% in the diagnosis of retinal changes for preoperative examination in canine cataracts. Though this diagnostic method does not replace ERG, it is rapid, simple and does not require sedation or anesthesia; in addition, it is easy to interpret and has low operative cost. Therefore, it may become a relevant predictive method in veterinarian ophthalmological practice.

Detecção de alterações na retina através da avaliação do reflexo pupilar evocado por luz vermelha em caninos com cataratas

**Objetivo.** O objetivo de nosso trabalho foi determinar a eficiência do diagnóstico pré-cirúrgico de alterações da retina através da avaliação do reflexo pupilar evocado por luz vermelha em caninos com cataratas, em comparação com o registro eletrorretinográfico.

**Métodos.** Em um ambiente obscuro se adaptou ao paciente durante 5 minutos e se iluminou o olho com luz vermelha; se repetiu a adaptação e se iluminou com luz branca. Em ambos os casos, se avaliou qualitativamente o tamanho da pupila no olho ipsilateral. Logo se adaptou ao animal durante 20 minutos e se registrou o eletrorretinograma (ERG). Reclutaram-se 161 olhos caninos.

**Resultados.** Do total de olhos examinados, 69 apresentaram alterações noERG (diminuição da amplitude das ondas a e b e aumento da latência), dos quais 59 não contraíram as pupilas em resposta a luz roja e 22 na responderam a luz branca. Os 92 olhos restantes apresentaram um ERG normal, dos quais 81 responderam à iluminação com luz roja e 84 a luz branca.

**Conclusão.** A determinação do reflexo pupilar evocado por luz vermelha teve uma sensibilidade de 88% no diagnóstico de alterações retinianas para o estudo pré-cirúrgico de cataratas caninas. Embora este método diagnóstico não substitua ao ERG, é rápido, fácil, não requiere de sedação nem anestesia, é de fácil interpretação e de baixo custo operativo, e pelo tanto pode-

ria constituir um método preditivo relevante na prática oftalmológica veterinária.

## Rol crítico del reclutamiento de leucocitos en el daño del nervio óptico inducido por neuritis óptica experimental

Aranda, Marcos L.<sup>a</sup>; Altschuler, Florencia<sup>a</sup>; González Fleitas, María F.<sup>a</sup>; Guerrieri, Diego<sup>b</sup>; Diéguez, Hernán H.<sup>a</sup>; Dorfman, Damián<sup>a</sup>; Rosenstein, Ruth E.<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratorio de Neuroquímica Retiniana y Oftalmología Experimental, Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, CEFyBO-CONICET.

<sup>b</sup>Laboratorio de Inmunomoduladores y Regeneración de Órganos, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires CEFyBO-CONICET.

**Introducción.** La neuritis óptica (NO) es una afección que involucra inflamación primaria, desmielinización y daño axonal en el nervio óptico que conduce a la pérdida de células ganglionares retinales (CGR), y una disminución en el reflejo pupilar (RP) frente a un estímulo de luz y en la amplitud de los potenciales visuales evocados (PVE). Las enfermedades neuroinflamatorias se caracterizan por la alteración de la barrera hematoencefálica (BHE) y el aumento de la infiltración de leucocitos al sistema nervioso central.

**Objetivo.** El objetivo del presente trabajo fue analizar la implicación de la infiltración celular en el daño visual inducido por NO experimental.

**Métodos.** Para ello, se inyectó LPS o vehículo en el nervio óptico de ratas *Wistar* macho adultas. Se analizó la integridad de la BHE a través de la perfusión con azul de Evans en ratas quimeras WT-GFP $\beta$ /WT.

**Resultados.** A las 6 horas después de la inyección de LPS se observó un aumento en la extravasación de azul de Evans y en el número de células en el nervio óptico. A las 24 horas después de la inyección se identificaron células e-GFP (+) (probablemente macrófagos y neutrófilos) en los nervios ópticos inyectados con LPS. La NO experimental indujo un aumento en la inmunorreactividad para la quimiocina CCL2. La inyección de bindarit (un inhibidor de CCL2) y la depleción de médula ósea (por irradiación gamma) impidieron significativamente el efecto

de la NO sobre el RP, la amplitud de los PVE y el número de CGR. Con el objetivo de alterar la integridad de la BHE se inyectó el activador de plasminógeno tisular (tPA) en el nervio óptico. La microinyección de tPA imitó el efecto de la NO sobre el RP y el número de CGR.

**Conclusión.** Estos resultados indican que la pérdida de integridad de la BHE y el reclutamiento de leucocitos desempeñan un papel clave en el daño visual inducido por NO experimental.

The critical role of leukocyte recruitment in experimental optic neuritis-induced optic nerve damage

**Introduction.** Optic neuritis (ON) is a disorder that involves primary inflammation, demyelination and axonal injury of the optic nerve leading to retinal ganglion cell (RGC) loss and reduced pupillary reflex (PR) when exposed to a light stimulus, as well as decreased amplitude of visual evoked potentials (VEP). Neuroinflammatory diseases are characterized by changes in the blood-brain barrier (BBB) and by an increase in leukocyte infiltration into the central nervous system.

**Objective.** The purpose of this paper was to analyze the implications of cell infiltration in experimental ON-induced visual damage.

**Methods.** To this end, LPS or vehicle was injected into the optic nerves of adult male Wistar rats. The integrity of the BBB was analyzed by means of perfusion with Evans blue dye in WT-GFP $\beta$ /WT chimera rats.

**Results.** Six hours after the LPS injection there was a rise in the Evans blue extravasation and in the number of optic nerve cells. Twenty-four hours after the injection, e-GFP(+) cells (probably macrophages and neutrophils) were identified in optic nerves injected with LPS. Experimental ON induced increased immunoreactivity for the chemokine CCL2. The injection of bindarit (a CCL2 inhibitor) and bone marrow depletion (by gamma radiation) significantly blocked the effect of ON on the PR, VEP amplitude and number of RGC. With the purpose of altering the integrity of the BBB, tissue plasminogen activator (tPA) was injected into the optic nerve. This tPA microinjection mim-

icked the effect of ON on the PR and number of RGC.

**Conclusion.** These results are indicative of the fact that BBB integrity loss and leukocyte recruitment have a key role in experimental ON-induced visual damage.

Rol crítico do recrutamento de leucócitos no dano do nervo óptico induzido por neurite óptica experimental

**Introdução.** A neurite óptica (NO) é uma afecção que envolve inflamação primária, desmielinização e dano dos axônios no nervo óptico que conduz à perda de células ganglionares retinianas (CGR), e uma diminuição no reflexo pupilar (RP) frente a um estímulo de luz e na amplitude dos potenciais visuais evocados (PVE). As doenças neuroinflamatórias se caracterizam pela alteração da barreira hematoencefálica (BHE) e o aumento da infiltração de leucócitos al sistema nervoso central.

**Objetivo.** O objetivo do presente trabalho foi analisar a implicação da infiltração celular no dano visual induzido por NO experimental.

**Métodos.** Para isso, se injetou LPS ou veículo no nervo óptico de ratos *Wistar* macho adultos. Se analisou a integridade da BHE através da perfusão com azul de Evans em ratos quimeras WT-GFP $\beta$ /WT.

**Resultados.** Às 6 horas da injeção de LPS se observou um aumento na extravasação de azul de Evans e no número de células no nervo óptico. Às 24 horas da injeção se identificaram células e-GFP (+) (provavelmente macrófagos e neutrófilos) nos nervos ópticos injetados com LPS. A NO experimental induziu um aumento na imunorreatividade para a quimiocina CCL2. A injeção de bindarit (um inibidor de CCL2) e a depleção de medula óssea (por irradiação gamma) impediram significativamente o efeito da NO sobre o RP, a amplitude dos PVE e o número de CGR. Com o objetivo de alterar a integridade da BHE se injetou o ativador de plasminógeno tisular (tPA) no nervo óptico. A microinjeção de tPA imitou o efeito da NO sobre o RP e o número de CGR.

**Conclusão.** Estes resultados indicam que a perda de integridade da BHE ou recrutamento



de leucócitos desempenham um papel chave no dano visual induzido por NO experimental.

---

35

---

## El sistema endocannabinoide es modulado por el estímulo lumínico en el segmento externo de los bastones de retina bovina

Chamorro Aguirre, Estefanía; Gaveglio, Virginia; Pasquaré, Susana

*Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca (INIBIBB), Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina.*

echamorro@inibib-conicet.gov.ar

El sistema endocannabinoide (SEC) está formado por los receptores cannabinoides (CB1, CB2, GPR55 y TRPV1), los ligandos que se unen a ellos, el 2-araquidonoil glicerol (2-AG) y la anandamida (AEA), y las enzimas responsables del metabolismo de estos lípidos. Estas moléculas están involucradas en mecanismos intracelulares de gran relevancia, teniendo funciones neuromoduladoras y neuroprotectoras. El SEC ha sido poco estudiado en la retina y, si bien se ha demostrado su presencia, aún se desconoce su rol funcional en la visión. La entrada de luz al ojo es censada por moléculas receptoras ubicadas en los discos del segmento externo de las células fotorreceptoras. A este nivel se inicia la conversión de la señal lumínica en señal eléctrica, proceso denominado fototransducción. El objetivo de la presente investigación fue determinar en el segmento externo de los bastones (ROS) la modulación del sistema endocannabinoide por el estímulo lumínico. Se evaluaron las actividades de las enzimas del metabolismo del 2-AG: la diacilglicerol lipasa (DAGL) y la lisofosfatidato fosfatasa (LPAPasa) (síntesis), y la monoacilglicerol lipasa (MAGL) (hidrólisis) en los ROS de retinas provenientes de ojos bovinos adaptados a la oscuridad (DROS) o expuestas a 3000 luxes por 30 minutos (LROS). DROS y LROS se purificaron en un gradiente discontinuo de sacarosa y los ensayos enzimáticos se realizaron con sustratos radiomarcados. En LROS respecto de DROS la actividad de la DAGL se incrementó (103%), mientras que la actividad de la LPAPasa no mostró diferencias. El MAG, generado por la DAGL, se metabolizó

a glicerol (37%) en ambas condiciones, lo que sugirió la acción de una MAGL. Esto se corroboró empleando MAG como sustrato exógeno, observándose un incremento (69%) en LROS. Los niveles de expresión proteica de las enzimas DAGLa y MAGL por *Western blot* fueron menores en LROS respecto de DROS. Por otra parte, en LROS aumentó la expresión de los receptores CB1 y CB2, disminuyó la del GPR55 y no se modificó la del TRPV1. Estos resultados evidencian que el SEC participaría activamente en el proceso de fototransducción.

*Financiamiento.* ANPCyT, SCyT-UNS, CONICET, CIC.

The endocannabinoid system is modulated by light stimulation in the rod outer segment of bovine retinas

The endocannabinoid system (ECS) is composed of cannabinoid receptors (CB1, CB2, GPR55 and TRPV1), ligands binding to them, 2-arachidonoylglycerol (2-AG) and anandamide (AEA), and enzymes responsible for the metabolism of these lipids. These molecules are involved in major intracellular mechanisms and they have neuromodulator and neuroprotective functions. The ECS has barely been studied in the retina, and though its presence has been established, its functional role in vision remains unknown. Light entry into the eye is censored by receptor molecules located in photoreceptor outer segment discs. Conversion of the light signal into an electrical signal, a process known as phototransduction, begins at this level. The purpose of this investigation was to determine ECS modulation of the rod outer segment (ROS) by the light stimulus. Activities of the 2-AG metabolism enzymes were evaluated: diacylglycerol lipase (DAGL), lysophosphatidate phosphatase (LPAPase) (synthesis) and monoacylglycerol lipase (MAGL) (hydrolysis) in retinal ROS from bovine eyes adapted to darkness (DROS) or exposed to 3,000 lux for 30 minutes (LROS). DROS and LROS were purified in a discontinuous sucrose gradient and enzyme assays were performed with radiolabeled substrates. In LROS, DAGL activity increased (103%) as compared to that of DROS, while LPAPase activ-

ity failed to show any difference. MAG, generated by DAGL, was metabolized to glycerol (37%) in both conditions, thus suggesting that the action of a MAGL was involved. This was corroborated by using MAG as an exogenous substrate, with a consequent increase (69%) in LROS. Protein expression levels of DAGL $\alpha$  and MAGL enzymes were lower in LROS vs. DROS, according to Western blot assays. On the other hand, LROS increased the expression of CB1 and CB2, decreased GPR55 expression and did not change TRPV1 expression. These results evidence that the ECS might be involved actively in the phototransduction process.

*Funding.* ANPCyT, SCyT-UNS, CONICET, CIC.

O sistema endocanabinóide é modulado pelo estímulo luminoso no segmento externo dos bastonetes de retina bovina

O sistema endocanabinóide (SEC) está formado pelos receptores canabinóides (CB1, CB2, GPR55 e TRPV1), os ligantes que se unem a eles, o 2-araquidonoil glicerol (2-AG) e a anandamida (AEA), e as enzimas responsáveis do metabolismo destes lípidos. Essas moléculas estão envolvidas em mecanismos intracelulares de grande relevância e tem funções neuromoduladoras e neuroprotetoras. O SEC tem sido pouco estudado na retina e, embora tenha se demonstrado sua presença, ainda se desconhece seu papel funcional na visão. A entrada de luz ao olho é recensear por moléculas receptoras localizadas nos discos do segmento externo das células fotorreceptoras. Neste nível inicia-se a conversão do sinal luminoso em sinal elétrica, processo denominado fototransdução. O objetivo da presente pesquisa foi determinar no segmento externo dos bastonetes (ROS) a modulação do sistema endocanabinóide pelo estímulo luminoso. Avaliaram-se as atividades das enzimas do metabolismo do 2-AG: a diacilglicerol lipasa (DAGL) e a lisofosfatidato fosfatase (LPAPasa) (síntese), e a monoacilglicerol lipasa (MAGL) (hidrólise) nos ROS de retinas provenientes de olhos bovinos adaptados à escuridão (DROS) ou expostas a 3000 luxes por 30

minutos (LROS). DROS e LROS se purificaram em um gradiente descontínuo de sacarosa e os ensaios enzimáticos se realizaram com substratos radiomarcados. Em LROS respeito de DROS, a atividade da DAGL se incrementou (103%), enquanto a atividade da LPAPasa não mostrou diferenças. O MAG, gerado pela DAGL, se metabolizou a glicerol (37%) em ambas as condições, o que sugeriu a ação de uma MAGL. Isso foi confirmado utilizando MAG como substrato exógeno, observando-se um incremento (69%) em LROS. Os níveis de expressão proteica das enzimas DAGL $\alpha$  e MAGL por *Western blot* foram menores em LROS respeito de DROS. Por outro lado, em LROS aumentou a expressão dos receptores CB1 e CB2, diminuiu a do GPR55 e não se modificou a do TRPV1. Estes resultados evidenciam que o SEC participaria ativamente no processo de fototransdução.

*Financiamento.* ANPCyT, SCyT-UNS, CONICET, CIC.

## Efecto neuroprotector del agonista del receptor CB1, ACEA, en la degeneración retinal inducida por la luz

Soliño M<sup>a</sup>, Barreiro M<sup>a</sup>, Rey-Funes M<sup>a</sup>, López EM<sup>a</sup>, Caltana L<sup>a</sup>, Brusco A<sup>a</sup>, Peláez R<sup>b</sup>, Larrayoz I<sup>b</sup>, Martínez A<sup>b</sup>, Girardi E<sup>a</sup>, López-Costa JJ<sup>a</sup>

<sup>a</sup> IBCN Prof. E. De Robertis, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires-CONICET.

<sup>b</sup> Centro de Investigación Biomédica de La Rioja (CIBIR), Logroño, España.

*Objetivos.* Los endocannabinoides son neuromoduladores cuyos efectos están mediados por receptores acoplados a la proteína G llamados CB1 y CB2. Los agonistas CB1 desempeñan un papel neuroprotector en modelos animales de glaucoma. La degeneración retinal inducida por la luz (LIRD) es un modelo que se asemeja a las enfermedades degenerativas de la retina humana como la degeneración macular asociada con la edad (DMAE). El objetivo de este trabajo fue evaluar el posible efecto neuroprotector de la modulación del receptor CB1 en LIRD.

*Métodos.* Los ojos derechos de ratas Sprague Dawley se inyectaron en forma intravítrea con

ACEA (agonista CB1) o con AM251 (antagonista CB1) mientras que los ojos izquierdos recibieron el vehículo como controles. Después de 24 horas de iluminación continua (12,000 lux) las retinas se disecaron y se procesaron mediante qRT-PCR, *Western blot* (WB), inmunohistoquímica (IHC) o técnica de TUNEL. Los anticuerpos para GFAP y para caspasa 3 activada se usaron en WB/IHC y WB respectivamente. Se cuantificaron las áreas inmunorreactivas para GFAP y el número de células TUNEL positivas. Todos los datos se analizaron estadísticamente mediante el test t de Student y las diferencias se consideraron significativas cuando  $p < 0,05$ .

**Resultados.** Los ojos tratados con ACEA mostraron niveles significativamente menores de ARNm de BAD, BCL2, CYP1A1, adrenomedulina y DAGL-B. Por el contrario, los ojos tratados con AM251 mostraron niveles significativamente mayores de ARNm de los genes apoptóticos BAD, BAX, BCL2, TNF; los receptores CB1, TRPV1 y receptor para arilhidrocarburos; factores angiogénicos, adrenomedulina y VEGF y enzimas FAAH, DAGL-A y B y NAPE.

Los estudios de WB mostraron que las retinas de los ojos tratados con ACEA contenían niveles significativamente más bajos de caspasa 3 activada y GFAP. Por el contrario, los ojos tratados con AM251 mostraron retinas con niveles significativamente más altos de caspasa 3 activada y GFAP.

La ACEA disminuyó significativamente tanto la muerte celular apoptótica en la capa nuclear externa (ONL) como la activación de la célula Müller en retinas iluminadas. Por el contrario, AM251 aumentó significativamente tanto la muerte celular apoptótica en ONL como la activación de células Müller.

**Conclusiones.** La administración de ACEA (agonista de CB1) previo al estrés de iluminación fue neuroprotectora, mientras que AM251 (antagonista de CB1) empeoró el daño de la retina en LIRD. Aunque es necesario continuar investigando, el agonismo del receptor CB1 puede considerarse una posible estrategia neuroprotectora en la DMAE.

**Subsidio.** Universidad de Buenos Aires, UBACYT 200-20130100675BA.

Neuroprotective effect of the CB1 receptor agonist (ACEA) in light-induced retinal degeneration

**Objectives.** Endocannabinoids are neuromodulators whose effects are mediated by G-protein-coupled receptors known as CB1 and CB2. CB1 agonists have a neuroprotective role in animal glaucoma models. Light-induced retinal degeneration (LIRD) is a model mimicking human retinal degenerative diseases such as age-related macular degeneration (AMD). The purpose of this paper was to evaluate the potential neuroprotective effect of CB1 receptor modulation in the LIRD.

**Methods.** The right eyes of Sprague Dawley rats received intravitreal injections of ACEA (a CB1 agonist) or AM251 (a CB1 antagonist) while the left eyes were administered vehicle and were used as controls. Twenty-four hours after continuous illumination (12,000 lux) the retinas were dissected and processed by qRT-PCR, Western blot (WB), immunohistochemistry (IHC) or TUNEL technique. Antibodies for GFAP and activated caspase 3 were used in WB/IHC and WB, respectively. GFAP-immunoreactive areas and TUNEL-positive cells were quantitated. All data were analyzed statistically by the t-Student test and differences were considered significant when  $p < 0.05$ .

**Results.** Eyes treated with ACEA had significantly lower mRNA levels of BAD, BCL2, CYP1A1, adrenomedullin and DAGL-B. Conversely, eyes treated with AM251 showed significantly higher mRNA levels of apoptotic genes BAD, BAX, BCL2, TNF; CB1, TRPV1 receptors and the receptor for aryl hydrocarbons; angiogenic factors, adrenomedullin and VEGF and FAAH, DAGL-A and B and NAPE enzymes.

WB assays evidenced that the retinas of eyes treated with ACEA contained significantly lower levels of activated caspase 3 and GFAP, in contrast to eyes receiving AM251, whose retinas showed significantly higher levels of activated caspase 3 and GFAP.

ACEA significantly reduced apoptotic cell death in the outer nuclear layer (ONL) as well as activation of Müller cells in illuminated retinas.

In contrast, AM251 increased both apoptotic cell death in the ONL and Müller cell activation significantly.

**Conclusions.** ACEA (a CB1 agonist) administration before illumination stress was neuroprotective, while AM251 (a CB1 antagonist) worsened retinal damage in the LIRD. Though further investigation is needed, CB1 receptor agonism can be considered as a possible neuroprotective strategy in AMD.

**Grant.** Universidad de Buenos Aires, UBACYT 200-20130100675BA.

Efeito neuroprotetor do agonista do receptor CB1, ACEA, na degeneração da retina induzida pela luz

**Objetivos.** Os endocanabinoides são neuromoduladores cujos efeitos estão mediados por receptores acoplados à proteína G chamados CB1 e CB2. Os agonistas CB1 desempenham um papel neuroprotetor em modelos animais de glaucoma. A degeneração da retina induzida pela luz (LIRD) é um modelo semelhante as doenças degenerativas da retina humana como a degeneração macular associada com a idade (DMRI). O objetivo deste trabalho foi avaliar o possível efeito neuroprotetor da modulação do receptor CB1 em LIRD.

**Métodos.** Os olhos direitos de ratos Sprague Dawley foram injetados em forma intravítrea com ACEA (agonista CB1) ou com AM251 (antagonista CB1) enquanto os olhos esquerdos receberam o veículo como controles. Depois de 24 horas de iluminação contínua (12,000 lux), as retinas se disseccionaram e se processaram por meio de qRT-PCR, *Western blot* (WB), imunohistoquímica (IHC) ou técnica de TUNEL. Os anticorpos para GFAP e para caspase 3 ativada se usaram em WB/IHC e WB respectivamente. Quantificaram-se as áreas imunorreativas para GFAP e o número de células TUNEL positivas. Todos os dados se analisaram estatisticamente através do teste t de Student e as diferenças se consideraram significativas quando  $p < 0,05$ .

**Resultados.** Os olhos tratados com ACEA mostraram níveis significativamente menores de ARNm de BAD, BCL2, CYP1A1, adrenomédula e DAGL-B. Pelo contrário, os olhos

tratados com AM251 mostraram níveis significativamente maiores de ARNm dos genes apoptóticos BAD, BAX, BCL2, TNF; os receptores CB1, TRPV1 e receptor para arilhidrocarbonos; fatores angiogênicos, adrenomédula e VEGF e enzimas FAAH, DAGL-A e B e NAPE.

Os estudos de WB mostraram níveis significativamente menores de caspase 3 ativada e GFAP nas retinas dos olhos tratados com ACEA. Pelo contrário, os olhos tratados com AM251 mostraram retinas com níveis significativamente maiores de caspase 3 ativada e GFAP.

A ACEA diminuiu significativamente tanto a morte celular apoptótica na capa nuclear externa (ONL) quanto a ativação da célula Müller em retinas iluminadas. Pelo contrário, AM251 acrescentou significativamente tanto a morte celular apoptótica em ONL quanto a ativação de células Müller.

**Conclusões.** A administração de ACEA (agonista de CB1) previamente ao estresse de iluminação foi neuroprotetora, enquanto AM251 (antagonista de CB1) piorou o dano da retina em LIRD. Embora seja preciso continuar pesquisando, o agonismo do receptor CB1 pode considerar-se uma possível estratégia neuroprotetora na DMAI.

**Subsídio.** Universidad de Buenos Aires, UBACYT 200-20130100675BA.

## Respuesta pupilar en fumadores: un estudio preliminar

Tripolone, Constanza<sup>a</sup>; Lacerda, Eliza<sup>b</sup>; Issolio, Luis<sup>a,c</sup>; Barriounuevo, Pablo<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Investigación en Luz, Ambiente y Visión-CONICET, Universidad Nacional de Tucumán, San Miguel de Tucumán, Argentina.

<sup>b</sup> Universidade Ceuma, São Luiz, Maranhão, Brasil.

<sup>c</sup> Departamento de Luminotecnia, Luz y Visión, Facultad de Ciencias Exactas y Tecnología, Universidad Nacional de Tucumán, San Miguel de Tucumán, Argentina.

mconstanzatripolone@gmail.com

**Introducción.** Existe evidencia de que el consumo de tabaco afecta funciones visuales como la percepción de color. Sin embargo, no hay trabajos que evalúen su efecto en funciones no visuales como el reflejo pupilar; por lo menos de nuestro conocimiento. El objetivo de este trabajo

es evaluar la respuesta pupilar en fumadores de tabaco y se presentan datos preliminares.

**Métodos.** Nueve sujetos participaron de la experiencia, de los cuales 4 fueron no-fumadores ( $29 \pm 1,8$  años, grupo control) y 5 fueron fumadores por más de 7 años ( $32,4 \pm 6$ ). Los sujetos fueron seleccionados luego de realizar una encuesta sobre el historial de salud personal y familiar. Con un fotoestimulador de 5 canales y un seguidor de ojo de alta velocidad (250 Hz) se midió la respuesta pupilar a la luz ante estimulación de pulso y de parpadeo. La estimulación de pulso se realizó durante 1 segundo de luz azul o roja (después de adaptación a fondo azul). Usando parpadeo se estimularon fotorreceptores por separado. Además se realizaron tests de visión de color, transmitancia del ojo, difusión intraocular y agudeza visual.

**Resultados.** Para ninguno de los parámetros de los tests realizados se encontraron diferencias significativas entre el grupo control y el grupo fumador. Sin embargo, para el grupo de fumadores se encontró una tendencia de la respuesta pupilar a un pulso de luz azul que indica un retraso con respecto de la del grupo control (962 ms vs 864 ms), aunque esta diferencia no llega a ser significativa ( $t = -2,06$ ,  $p = 0,08$ ).

**Conclusión.** No se encontraron diferencias significativas en la respuesta pupilar debido al consumo de tabaco. La posibilidad de que la respuesta pupilar se ralentice debe ser confirmada con una muestra mayor de sujetos.

#### Pupillary response in smokers: a preliminary study

**Introduction.** There is plenty of evidence supporting that tobacco consumption affects visual functions such as color perception. However, to our knowledge, there are no papers in the literature evaluating the effects of tobacco on non-visual functions such as the pupillary light reflex. The purpose of this paper is to evaluate pupillary response in smokers and to report preliminary data.

**Methods.** Nine subjects were included, of whom 4 were non-smokers ( $29 \pm 1.8$  years, control group) and 5, smokers for more than 7 years ( $32.4 \pm 6$ ). Subjects were selected after

completing a questionnaire on their personal and family history. With a 5-channel photo-stimulator and a high-speed eye tracker (250 Hz), pupillary response to pulse or flicker light stimuli was measured. Pulse stimulation was carried out for 1 second using blue or red light (after adaptation to a blue background) while photoreceptors were stimulated separately with the use of flickers. In addition, color vision, eye transmittance, intraocular diffusion and visual acuity tests were performed.

**Results.** No significant differences were found for any of the parameters tested between the control group and the smokers' group. However, for the smokers' group there was a trend towards pupillary response to a blue light pulse, suggestive of a delay in comparison with the control group (962 ms vs 864 ms), though this difference failed to be significant ( $t = -2.06$ ,  $p = 0.08$ ).

**Conclusion.** No significant differences were found in pupillary response due to tobacco consumption. Therefore, whether pupillary response is slowed down should be confirmed by further studies using a larger population.

#### Resposta pupilar em fumantes: um estudo preliminar

**Introdução.** Existe evidencia de que o consumo de tabaco afeta funções visuais como a percepção de color. Porém, não há trabalhos que avaliem seu efeito em funções não visuais como o reflexo pupilar; pelo menos de nosso conhecimento. O objetivo deste trabalho é avaliar a resposta pupilar em fumantes de tabaco e apresentar dados preliminares.

**Métodos.** Nove sujeitos participaram da experiência, dos quais 4 foram não-fumantes ( $29 \pm 1,8$  anos, grupo controle) e 5 foram fumantes por mais de 7 anos ( $32,4 \pm 6$ ). Os sujeitos foram selecionados logo de realizar uma enquete sobre o historial de saúde pessoal e familiar. Com um fotoestimulador de 5 canais e um seguidor de olho de alta velocidade (250 Hz) se mediu a resposta pupilar à luz frente a estimulação de pulso e de piscada. A estimulação de pulso se realizou durante 1 segundo de luz azul ou vermelha (depois de adaptação a fundo azul). Usando piscada se estimularam fotorreceptores por sepa-

rado. Além disso, se realizaram testes de visão de color, transmitância do olho, difusão intraocular e acuidade visual.

**Resultados.** Para ninguém dos parâmetros dos testes realizados se encontraram diferenças significativas entre o grupo controle e o grupo fumante. Porém, para o grupo de fumantes se encontrou uma tendência da resposta pupilar a um pulso de luz azul que indica um retraso com respeito da do grupo controle (962 ms vs 864 ms), embora essa diferença no é significativa ( $t = -2,06$ ,  $p = 0,08$ ).

**Conclusão.** Não foram encontradas diferenças significativas na resposta pupilar devido ao consumo de tabaco. A possibilidade de que a resposta pupilar se desacelere deve ser confirmada com uma amostra maior de sujeitos.

## Efectos de una dieta rica en fructosa en la integridad vascular y funcionalidad neuronal en la retina de ratones hipercolesterolémicos

Paz MC<sup>a</sup>, Barcelona P<sup>a</sup>, Subirada PV<sup>a</sup>, Ridano ME<sup>a</sup>, Chiabrandó G<sup>a</sup>, Castro C<sup>b</sup>, Sánchez MC<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, CIBICI-CONICET, Córdoba, Argentina.

<sup>b</sup> Laboratorio de Biología Vascular, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo. IMBECU-CONICET, Mendoza, Argentina.

La diabetes mellitus tipo 2 es consecuencia del síndrome metabólico (SM) y la retinopatía diabética (RD) es una de sus más serias complicaciones y causa de ceguera en el mundo. En este trabajo se propuso analizar marcadores de la integridad vascular y de la funcionalidad neuronal relacionados con estadios tempranos de la RD en un modelo de SM.

Se alimentaron ratones C57BL/6 (WT) y apolipoproteína E *knockout* (ApoE-KO) con una dieta normal (DN) o una dieta con 10% de fructosa en el agua de bebida (FD) a partir de los 2 meses de edad. Se llevaron a cabo estudios cinéticos entre los 2 y los 6 meses de dieta.

El grupo ApoE-KO, espontáneamente hipercolesterolémico, mostró un aumento en LDL-colesterol y, al ser alimentados con DF, mostraron también hipertrigliceridemia y disminución

de HDL-colesterol, además de hiperglucemia y un test de tolerancia a la glucosa alterado. El estudio de ERG escotópico mostró una disminución en la amplitud de las ondas a y b y de los PO en el grupo ApoE-KO DF vs. WT DN, lo que correlacionó con un aumento en células TUNEL positivas. Se observó una elevada permeabilidad vascular en los ratones ApoE-KO FD, evidenciada por la extravasación de azul de Evans (e.v.) así como de albúmina y  $\alpha$ 2-macroglobulina. Se observó expresión de GFAP en astrocitos pero no en células gliales de Müller (CGM), indicando que no hay gliosis reactiva en las retinas de ApoE-KO FD, lo que correlacionó con una normal expresión de glutamina sintetasa, indicando integridad de las CGM. Sin embargo, en flat de retinas completas se observó una disminución en la inmunorreactividad a GFAP, lo que podría explicar, en parte, la reducida integridad de la barrera hematorretinal. La expresión de RNAm de HIF y VEGF no se vio modificada en ningún grupo, indicando que los cambios observados, al tiempo evaluado, se asocian con estadios tempranos de la RD, sin características relacionadas con etapas de neovascularización.

Los resultados mostraron que los ratones ApoE-KO DF, los cuales reproducen características del SM humano, presentan disfunción vascular y neurodegeneración sin alteraciones relacionadas con isquemia tisular. Por lo tanto, este modelo ofrece la oportunidad de estudiar estadios tempranos de la RD, cuya prevalencia aumenta en el mundo.

**Financiamiento.** SECYT, FONCYT.

Effects of a high-fructose diet on vascular integrity and neuronal functionality in the retinas of hypercholesterolemic mice

Type 2 diabetes mellitus is a consequence of metabolic syndrome (MS) and diabetic retinopathy (DR) is one of its most serious complications, and the cause of blindness worldwide. In this paper the goal was to analyze markers of vascular integrity and neuronal functionality related to the early stages of DR in a MS model.

C57BL/6 (WT) and apolipoprotein E knockout (ApoE-KO) mice were fed a normal diet

(ND) or a diet with 10% fructose in drinking water (FD) as from 2 months of age. Kinetic studies were carried out between 2 and 6 months of the diet.

The ApoE-KO group, spontaneously hypercholesterolemic, evidenced an increase in LDL-cholesterol and, when fed a FD, they also developed hypertriglyceridemia and a reduction in HDL-cholesterol, in addition to hyperglycemia and impaired glucose tolerance test results. Scotopic ERG evidenced a decrease in a- and b-waves and in the OP of the ApoE-KO FD vs WT ND mice correlating with an increase in TUNEL-positive cells. There was elevated vascular permeability in ApoE-KO FD mice, evidenced by extravasation of Evans blue, as well as of albumin and  $\alpha 2$ -macroglobulin. We observed GFAP expression in astrocytes but not in Müller glial cells (MGC), which is indicative of the fact that there is no reactive gliosis in ApoE-KO FD mice correlating with normal glutamine synthetase expression, suggestive of MGC integrity. However, in whole retina flat-mounts there was a decrease in GFAP immunoreactivity that may be partially accounted for by the reduced integrity of the blood-retinal barrier. No changes in HIF and VEGF mRNA expression were found in any of the groups and this suggests that changes observed at the time-point evaluated are associated with early stages of DR, with no features related to neovascularization stages.

Results evidenced that ApoE-KO FD mice, which reproduce characteristics of human MS, have vascular dysfunction and neurodegeneration with no tissue ischemia-related changes. Therefore, this model provides an opportunity to study the early stages of DR that has an increasing prevalence worldwide.

*Funding.* SECYT, FONCYT.

Efeitos de uma dieta rica em frutose na integridade vascular e funcionalidade neuronal na retina de ratos hipercolesterolêmicos

A diabetes mellitus tipo 2 é consequência da síndrome metabólica (SM) e a retinopatia diabética (RD) é uma de suas mais sérias complicações e causa de cegueira no mundo. Neste

trabalho se propôs analisar marcadores da integridade vascular e da funcionalidade neuronal relacionados com fases precoces da RD em um modelo de SM.

Alimentaram-se ratos C57BL/6 (WT) e apolipoproteína E *knockout* (ApoE-KO) com uma dieta normal (DN) ou uma dieta com 10% de frutose na água de bebida (FD) a partir dos 2 meses de idade. Realizaram-se estudos cinéticos entre os 2 e os 6 meses de dieta.

O grupo ApoE-KO, espontaneamente hipercolesterolêmico, mostrou um aumento em LDL-colesterol e, ao serem alimentados com DF, mostraram também hipertrigliceridemia e diminuição de HDL-colesterol, além de hiperglicemia e um teste de tolerância à glucose alterado. O estudo de ERG escotópico mostrou uma diminuição na amplitude das ondas a e b e dos PO no grupo ApoE-KO DF vs. WT DN, o que correlacionou com um aumento em células TUNEL positivas. Observou-se uma elevada permeabilidade vascular nos ratos ApoE-KO FD, evidenciada pela extravasação de azul de Evans (e.v.) assim como de albumina e  $\alpha 2$ -macroglobulina. Observou-se expressão de GFAP em astrócitos, mas não em células gliais de Müller (CGM), indicando que não há gliose reativa nas retinas de ApoE-KO FD, o que correlacionou com uma normal expressão de glutamina sintetase, indicando integridade das CGM. Porém, em flat de retinas completas se observou uma diminuição na imunoreatividade a GFAP, o que poderia explicar, em parte, a reduzida integridade da barreira hematorretiniana. A expressão de RNAm de HIF e VEGF não sofreu alterações em nenhum grupo, indicando que as alterações observadas, ao tempo avaliado, se associam com fases precoces da RD, sem características relacionadas com etapas de neovascularização.

Os resultados mostraram que os ratos ApoE-KO DF, os quais reproduzem características do SM humano, apresentam disfunção vascular e neurodegeneração sem alterações relacionadas com isquemia tissular. Pelo tanto, este modelo oferece a oportunidade de estudar fases precoces da RD, cuja prevalência aumenta no mundo.

*Financiamento.* SECYT, FONCYT.

## Modelo experimental de opacificación capsular posterior en conejos

Manlla, Luis; Tártara, Ignacio; Campana, Vilma; Guaycochea, Mariana; Caballero, Gabriela; Cremonuzzi, David

**Introducción.** La opacificación capsular posterior (OCP) (catarata secundaria) sigue siendo un problema clínico importante: aparece en pacientes intervenidos quirúrgicamente para extraerles las cataratas. Esta forma de OCP puede tratarse mediante la ablación de la cápsula posterior con láser, procedimiento costoso que depende de tecnología avanzada y que se acompaña de un riesgo de complicaciones graves. Se requieren nuevos estudios para determinar los factores responsables de la aparición de OCP y su prevención, con el fin de simplificar la cirugía de cataratas y reducir la necesidad de tratamiento de la OCP.

**Objetivos.** Determinar los diferentes grados de OCP en conejos, según el tiempo transcurrido posterior a la extracción del cristalino y su correlación histológica.

**Materiales y métodos.** Se utilizaron 5 conejos hembras de raza New Zealand (2,5 kg), a los que se les extrajo el cristalino claro del ojo izquierdo. Se realizaron controles semanales para evaluar la progresión del desarrollo de la OCP, sacrificando a los animales a diferentes tiempos para posterior estudio anatomopatológico y luego se fotografiaron los cortes. La evaluación se realizó con fotografías bajo control biomicroscópico con lámpara de hendidura. Se utilizó una escala subjetiva en cruces (+ a +++) para evaluar el grado de OCP. El análisis estadístico se realizó con ANOVA-prueba de Kruskal Wallis, considerando significativa la diferencia para  $p < 0,05$ .

**Resultados.** La proliferación celular observada incrementó de forma similar en los 5 conejos: en el día 7 y 14 no se observaron modificaciones; en los días 21 (+), 28 (++) , 35 (+++) y el mayor grado de OCP (++++) se observó a partir de los 42 días en todos los animales. Existe diferencia significativa entre los diferentes grados de OCP durante los días controlados ( $p < 0,0002$ ). Estos resultados conciden con los hallazgos en las microfotografías.

**Conclusiones.** La OCP que aparece en los conejos intervenidos nos permite tener un modelo animal válido para evaluar, en forma rápida y reproducible, lo que sucede en el ser humano, permitiendo estudiar la fisiopatogenia de la OCP y evaluar diferentes tratamientos para evitar su aparición o desarrollo.

**Financiamiento.** Subsidios de la Secretaría de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Córdoba.

Experimental model of posterior capsular opacification in rabbits

**Introduction.** Posterior capsular opacification (PCO) (secondary cataract) still remains as a significant clinical issue: it appears in patients who have undergone cataract extraction surgery. This form of PCO can be treated by posterior capsule laser ablation, a costly procedure depending on state-of-the-art technology and which is associated with a risk of serious complications. New studies are required to determine the factors responsible for PCO occurrence and its prevention with an aim at simplifying cataract surgery and reducing the need for PCO treatment.

**Objectives.** To determine the different grades of PCO in rabbits according to the time elapsed after crystalline lens extraction and their histologic correlation.

**Materials and methods.** Five female New Zealand rabbits (2.5 kg) underwent left eye clear lens extraction. Follow-ups were made at weekly intervals to evaluate progression of PCO. Rabbits were euthanized at different time-points for histopathologic diagnosis and slides were photographed subsequently. Evaluation was performed with photographs under slit-lamp biomicroscopic control. A subjective scale using plus symbols (from + to +++) was used to evaluate the PCO grade. Statistical analysis was carried out with the Kruskal-Wallis ANOVA test and the statistically significant difference was set at  $p < 0.05$ .

**Results.** Cell proliferation observed increased similarly in all 5 rabbits: on days 7 and 14 there were no changes, while changes occurred on



days 21 (+), 28 (++) , 35 (+++), with the greatest grade of PCO (++++) found as from 42 days in all rabbits. There is a significant difference between the distinct PCO grades during all the days of follow-up ( $p < 0.0002$ ). These results are consistent with the findings made in microphotographs.

**Conclusions.** PCO appearing in rabbits that underwent surgical treatment enables us to have a valid animal model to evaluate what happens in humans rapidly and reproducibly. The pathophysiology of PCO can thus be studied and different treatments can be evaluated to prevent PCO emergence or development.

**Funding.** Subsidies of the Secretary of Science and Technology of Universidad Nacional de Córdoba.

Modelo experimental de opacificação capsular posterior em coelhos

**Introdução.** A opacificação capsular posterior (OCP) (catarata secundária) continua sendo um problema clínico importante: aparece em pacientes intervindos cirurgicamente para lhes extrair as cataratas. Esta forma de OCP pode tratar-se por meio da ablação da cápsula posterior com laser, procedimento custoso que depende de tecnologia avançada acompanhada de um risco de complicações graves. Requerem-se novos estudos para determinar os fatores responsáveis da aparição de OCP e sua prevenção, com o fim de simplificar a cirurgia de cataratas e de reduzir a necessidade de tratamento da OCP.

**Objetivos.** Determinar os diferentes grãos de OCP em coelhos, segundo o tempo decorrido posterior a extração do cristalino e sua correlação histológica.

**Materiais e métodos.** Utilizaram-se 5 coelhos fêmea de raça New Zealand (2,5 kg), aos que se lhes extraiu o cristalino claro do olho esquerdo. Realizaram-se controles semanais para avaliar a progressão do desenvolvimento da OCP, sacrificando aos animais a diferentes tempos para posterior estudo anatomopatológico e logo foram fotografados os cortes. A avaliação se realizou com fotografias sob controle biomicroscópico com lâmpada de fenda. Utilizou-se uma escala

subjéctiva em cruzamentos (+ a +++) para avaliar o grão de OCP. A análise estatística se realizou com ANOVA-prova de Kruskal Wallis, considerando significativa a diferença para  $p < 0,05$ .

**Resultados.** A proliferação celular observada incrementou de forma similar nos 5 coelhos: no dia 7 e 14 não se observaram modificações; nos dias 21 (+), 28 (++) , 35 (+++) e o maior grão de OCP (++++) se observou a partir dos 42 dias em todos os animais. Existe diferença significativa entre os diferentes grãos de OCP durante os dias controlados ( $p < 0,0002$ ). Estes resultados condizem com os achados nas microfotografias.

**Conclusões.** A OCP que aparece nos coelhos intervindos permite ter um modelo animal válido para avaliar, em forma rápida e reproduzível, o que acontece no ser humano, permitindo estudar a fisiopatogenia da OCP e avaliar diferentes tratamentos para evitar sua aparição ou desenvolvimento.

**Financiamento.** Subsídios da Secretaria de Ciência e Tecnologia da Universidade Nacional de Córdoba.

## Insulina induce la exocitosis de LRP1 hacia la superficie celular de células gliales de Müller

Actis Dato, Virginia; Sánchez, María Cecilia; Chiabrando, Gustavo Alberto

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

LRP1 es un miembro de la familia de los receptores de LDL que se expresa en las células gliales de Müller (CGM) de la retina y que además de su función como un receptor endocítico, regula diversos procesos como ser la motilidad y funcionalidad de estas células. En la retina, las CGM cumplen un rol fundamental de soporte estructural y funcional a neuronas y vasos sanguíneos retinales. Numerosas funciones de estas células pueden estar influenciadas por acción de la insulina, aunque el efecto de esta hormona en este tipo celular no está claro aún. En este sentido LRP1 es responsable de regular la actividad de las metaloproteinasas MMP-2 y MT1-MMP así como la expresión de la proteína GFAP en

CGM. En estos procesos es fundamental el nivel de expresión de LRP1 en la membrana plasmática, lo cual estaría regulado desde el espacio extracelular por insulina, involucrando procesos de tráfico intracelular aún no establecidos. En el presente trabajo investigamos si la insulina induce la exocitosis regulada de LRP1 hacia la superficie celular, como así también el efecto de la alteración de este tráfico en la respuesta a insulina en la línea celular derivada de células gliales de Müller humanas, MIO-M1. Nuestros resultados demostraron que la insulina promovió la translocación de LRP1 hacia la membrana plasmática desde pequeñas vesículas intracelulares que almacenaban este receptor ( $\leq 100$  nm). Estas estructuras vesiculares estaban compuestas además por otras proteínas estructurales como sortilina y VAMP2, y también incorporaban el transportador de glucosa GLUT4 cuando éste era ectópicamente expresado. Además, encontramos que este tráfico de LRP1 inducido por la insulina fue mediado por la activación intracelular del eje IR / PI3K / Akt, como así también por la participación de las GTPasas Rab8A y Rab10. Por último, mediante la utilización de versiones constitutivamente inactivas de Rab8A y Rab10 encontramos una alteración en la señalización intracelular inducida por insulina, lo que sugiere que el nivel de LRP1 en la superficie celular es fundamental para la activación del IR inducida por la insulina en células MIO-M1. Estos resultados podrían tener implicancias fisiopatológicas en los procesos de neurodegeneración retinal que se producen durante la retinopatía diabética.

Insulin-induced low-density lipoprotein receptor-related protein-1 exocytosis to the cell surface of Müller glial cells

Low-density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP1) is an LDL receptor family member expressed in retinal Müller glial cells (MGC) that, in addition to its function as an endocytic receptor, regulates several processes such as MGC motility and functionality. In the retina, MGCs play a key role in the structural and functional support of retinal neurons and blood vessels. Numerous functions of these

cells can be influenced by the action of insulin, though the effect of this hormone on this cell type still remains unclear. In this regard, LRP1 is responsible for the regulation of the activity of the matrix metalloproteinases MMP-2 and MT1-MMP, as well as for GFAP proteinase expression in MGCs. In these processes, LRP1 expression in the plasma membrane is critical, since it might be regulated from the extracellular space by insulin, with involvement of intracellular traffic processes that have still not been established. In this paper, we investigated whether insulin induces the regulated exocytosis of LRP1 to the cell surface, as well as the effect of changes in this traffic in response to insulin in the cell line derived from human MGCs, MIO-M1. Our results demonstrated that insulin promoted LRP1 translocation to the plasma membrane from small intracellular vesicles where this receptor was stored ( $\leq 100$  nm). These vesicular structures, in addition, were composed of other structural proteins such as sortilin and VAMP2, and also incorporated the glucose transporter GLUT4 when it was ectopically expressed. Moreover, we found that this insulin-induced LRP1 traffic was mediated by the intracellular activation of the IR / PI3K / Akt axis, as well as by the involvement of the rab GTPases Rab8A and Rab10. Finally, with the use of constitutively inactive Rab8A and Rab10 versions we found impaired insulin-induced intracellular signaling, thus suggesting that LRP1 levels in the cell surface are vital for insulin-induced IR activation in MIO-M1 cells. These results may have pathophysiologic implications in the retinal neurodegeneration processes occurring during diabetic retinopathy.

Insulina induz a exocitose de LRP1 para a superfície celular de células gliais de Müller

LRP1 é um membro da família dos receptores de LDL que se expressa nas células gliais de Müller (CGM) da retina e que além de sua função como um receptor endocítico, regula diversos processos como a motilidade e a funcionalidade dessas células. Na retina, as CGM têm um papel fundamental de suporte estru-

tural e funcional para neurônios e vasos sanguíneos retinianos. Numerosas funções destas células podem estar influenciadas por ação da insulina, embora o efeito desse hormônio neste tipo celular ainda não é claro. Neste sentido, LRP1 é responsável de regular a atividade das metaloproteinases MMP-2 e MT1-MMP e a expressão da proteína GFAP em CGM. Nestes processos é fundamental o nível de expressão de LRP1 na membrana plasmática, o qual estaria regulado desde o espaço extracelular por insulina, envolvendo processos de tráfico intracelular ainda não estabelecidos. No presente trabalho, pesquisamos se a insulina induz a exocitose regulada de LRP1 para a superfície celular, como também o efeito da alteração deste tráfico na resposta a insulina na linha celular derivada de células gliais de Müller humanas, MIO-M1. Nossos resultados demonstraram que a insulina promoveu a translocação de LRP1 para a membrana plasmática

desde pequenas vesículas intracelulares que armazenavam este receptor ( $\leq 100$  nm). Essas estruturas vesiculares estavam compostas além, por outras proteínas estruturais como sortilina e VAMP2, e também incorporavam o transportador de glicose GLUT4 quando este era ectopicamente expressado. Além disso, encontramos que este tráfico de LRP1 induzido pela insulina foi mediado pela ativação intracelular do eixo IR / PI3K / Akt, bem como pela participação das GTPasas Rab8A e Rab10. Por último, por meio da utilização de versões constitutivamente inativas de Rab8A e Rab10 encontramos uma alteração na sinalização intracelular induzida por insulina, o que sugere que o nível de LRP1 na superfície celular é fundamental para a ativação do IR induzida pela insulina em células MIO-M1. Estes resultados poderiam ter implicações fisiopatológicas nos processos de neurodegeneração da retina que se produzem durante a retinopatia diabética.

## Indice de autores / Authors' index / Índice de autores

Los números luego de cada nombre indican la numeración correspondiente a los resúmenes.

Numbers after names indicate the numbering corresponding to the abstracts.

Os números após cada nome indicam a numeração correspondente aos resumos.

- Actis Dato V, 40  
Ahmad I, 2  
Alaimo A, 10, 11  
Altschuler F, 29, 34  
Aranda ML, 10-11, 16, 29, 34  
Armiento N, 22  
Ayala-Peña VB, 22  
Barcelona PF, 7, 14, 28, 31, 38  
Bareja R, 9  
Barreiro M, 21, 36  
Barrionuevo P, 37  
Barros MF, 17  
Becerra P, 8, 15  
Benedicto I, 9  
Bermúdez V, 25  
Bizai G, 20  
Bonacci GR, 14  
Brusco A, 36  
Byrne A, 6  
Caballero G, 39  
Caltana L, 36  
Campana V, 39  
Canto Soler V, 5  
Castro C, 38  
Chamorro Aguirre E, 35  
Chiabrando GA, 28, 38, 40  
Chianelli MS, 16, 29  
Cotter T, 6  
Cremonuzzi D, 39  
De los Santos B, 12  
Devouassoux J, 16  
Dibo MJ, 27  
Diéguez HH, 10-11, 16, 34  
Dorfman D, 10-11, 16, 29, 34  
Drozdowicz B, 20  
Elemento O, 9  
Evin D, 20  
Fliesler SJ, 1  
Gallo JE, 19, 24  
Gaveglío V, 35  
German OL, 12, 15, 22  
Ginsberg M, 9  
Girardi E, 36  
Giusio F, 13  
Giusto NM, 25  
González Castellanos A, 17  
González Fleitas MF, 10, 11, 16, 29, 34  
Guantay C, 17  
Guaycochea M, 39  
Guerrieri D, 34  
Hadad A, 20  
Hanke-Gogokhia C, 9  
Hu Y, 9  
Iaquinandi Murtagh A, 33  
Issolio L, 37  
Joyner AL, 9  
Keller Sarmiento I, 16  
Lacerda E, 37  
Larrayoz I, 36  
Lehmann GL, 9  
Loidl CF, 21  
López EM, 21, 36  
López Costa JJ, 21, 36  
López Martínez L, 33  
Lorenc VE, 7  
Luna JD, 7, 31  
Manlla L, 39  
Marazita MC, 26, 32  
Márquez GE, 31  
Márquez MA, 31  
Marquioni Ramella MD, 26, 32  
Martínez A, 36  
Mateos MV, 25  
Michelis G, 15  
Mista C, 23  
Monteoliva G, 13  
Nolan DJ, 9  
Ortiz Basso T, 13, 18  
Ortiz GA, 24  
Pasquaré S, 35  
Paz MC, 7, 14, 28, 38  
Paz MP, 31  
Peláez R, 36  
Petrigliano M, 19, 24  
Politi LE, 12, 15, 27  
Potilinski MC, 19, 24  
Prado Spalm FH, 27, 30  
Rafii S, 9  
Rey Funes M, 21, 36  
Reyes H, 33  
Ridano ME, 7, 14, 28, 31, 38  
Roche S, 6  
Rodríguez Boulán E, 9  
Romeo EH, 11  
Romeo HH, 10  
Rosenstein RE, 10-11, 16, 29, 34  
Rotstein NP, 12, 15, 27, 30  
Ruiz-Lopez A, 6  
Sabbi TN, 31  
Saidman G, 13  
Salvatelli A, 13, 20  
Sánchez MC, 7, 14, 28, 31, 38, 40  
Sande PH, 10-11, 16, 29  
Sande Casal P, 33  
Scolaro LA, 22  
Serra HM, 17  
Setton P, 3  
Simón MV, 27, 30  
Soliño M, 21, 36  
Soto T, 12  
Stenkamp D, 4  
Suárez MF, 17  
Subirada PV, 7, 14, 28, 31, 38  
Suburo AM, 26, 32  
Tártara I, 39  
Tate PS, 26, 32  
Tenconi PE, 25  
Torres RM, 13, 20, 23  
Tripolone C, 37  
Urrets Zavalía JA, 13, 17  
Vaglianti MV, 7, 14, 28, 31  
Vera MS, 27, 30  
Wojcinski A, 9  
Zalazar M, 23



# SERVICIOS

## Servicios, beneficios y descuentos

Los Socios CAO pueden acceder a todos estos servicios.

- Certificación y revalidación.
- Seguros de praxis médica.
- Consultas periciales.
- Seguros de accidentes personales.
- Beneficios y descuentos.
- Búsquedas bibliográficas on line.

 (011) 4374-5400, int. 202

 [www.ofthalmologos.org.ar/servicios](http://www.ofthalmologos.org.ar/servicios)

 [administracion@oftalmologos.org.ar](mailto:administracion@oftalmologos.org.ar)

**CAO**  
SERVICIOS



# PFÖRTNER

CONTACTOLOGIA - OPTICA

---

EXCELENCIA EN PRESTACIONES ÓPTICAS

Casa Central: Av. Pueyrredón 1706 - C1119ACN Bs. As. - Tel.: (54-11) 4827-8600 - Fax: (54-11) 4827-8615  
info@pfortner.com - www.pfortner.com y Centros de Atención Cornealent. Consulte a su oftalmólogo.

Imagen al sólo efecto ilustrativo, no vinculante. Todos los derechos reservados.