

# Jornadas AIVO Córdoba 2013

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

15 de noviembre de 2013

Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina

### *AIVO Meeting Córdoba 2013* *Association for Research in Vision and Ophthalmology*

November 15th, 2013

Chemical Sciences Faculty, National University of Córdoba, Argentina.

### *Jornadas AIVO Córdoba 2013* *Associação para Pesquisa em Visão e Oftalmologia*

15 de novembro de 2013

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

---

RESÚMENES DE INVESTIGACIONES PRESENTADAS  
ABSTRACTS OF RESEARCH PAPERS PRESENTED  
RESUMOS DAS PESQUISAS APRESENTADAS

---

## Estudio preliminar de un microsensor óptico para medición de la presión intraocular (IOP)

Braggio L<sup>a</sup>, Guarnieri FA<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Centro de Investigación de Métodos Computacionales (CI-MEC-CONICET), Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina.

<sup>b</sup>Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Entre Ríos (UNER)

Contacto: luciano.braggio@gmail.com

*Introducción.* A la hora de realizar el tratamiento de pacientes con glaucoma es de fundamental importancia contar con una correcta medición de la IOP. Es por esto que un dispositivo que cuente con

características tales como ser de pequeñas dimensiones, tener buena sensibilidad, ser portable (o incluso implantable), biocompatible y que además pueda integrarse a un sistema más complejo (sensado y actuación), resulta interesante para dicho fin. Los BioMEMS, por sus siglas en inglés, son sistemas micro-electro-mecánicos desarrollados con el fin de tener una aplicación biomédica. Entre sus principales características se pueden mencionar sus muy pequeñas dimensiones y el hecho de ser biocompatibles. Los MOEMS son aquellos sistemas donde se incluyen además componentes ópticos. En este trabajo se presenta el diseño, simulación y fabricación de un prototipo de microsensor óptico pasivo (MOEMS) para la medición

de la IOP. Dicho microsensors está basado en los cambios en las propiedades ópticas de una red de difracción que se producen cuando un aumento en la IOP deforma mecánicamente dicha red. La simulación de un microsensors con estas características permite comprender de manera precisa los principios físicos subyacentes, a la vez que dan una correcta idea de aquellos parámetros clave en el diseño de dicho dispositivo. El prototipo diseñado y fabricado consiste en una red de difracción de 1 [mm<sup>2</sup>] y de 100 [μm] de espesor. El material utilizado es un elástomero (PDMS) con excelentes propiedades para este tipo de aplicaciones.

**Objetivos.** Diseñar un microsensors óptico pasivo para la medición de la IOP. Definir y establecer los parámetros determinantes del dispositivo. Simular el principio físico por el cual se mide la IOP. Fabricar un prototipo del microsensors y evaluar el principio de su funcionamiento. Comparar los resultados obtenidos con aquellos logrados de la simulación y validar el modelo.

*Metodología.*

- *Simulación computacional:* 1) A partir de trabajos previos y pruebas experimentales se definió un modelo mecánico que permitiese describir fidedignamente la respuesta mecánica del material ante un aumento de la IOP. 2) Con los resultados mecánicos se calculó la variación en el *pitch* (período) de la red de difracción, parámetro clave para poder realizar el monitoreo. 3) Se realizó la simulación de la parte mecánica utilizando el *método de elementos finitos* con un modelo de material hiperelástico (Mooney-Rivlin). 4) La parte óptica fue simulada con un *software* para diseño y análisis de sistemas ópticos, utilizando la técnica de *ray tracing*. 5) Dichos modelos mecánico y óptico fueron acoplados con objeto de evaluar el comportamiento del microsensors.

- *Fabricación y pruebas experimentales:* 1) A partir de la técnica de microfabricación llamada *Soft Lithography* se implementó el prototipo con las dimensiones anteriormente mencionadas. El material utilizado fue el PDMS. 2) Las redes

de difracción obtenidas fueron caracterizadas tanto óptica como mecánicamente con el fin de comparar los resultados con aquellos obtenidos de la simulación y evaluar posibles rediseños.

*Resultados y discusión.* Los resultados obtenidos del modelo mecánico muestran que en el rango de interés el modelo describe correctamente la deformación de la red de difracción del microsensors. Lo anterior es de fundamental importancia ya que permite que el sensor pueda medir la IOP en los valores deseados (hasta 2500 [Pa]). Del modelo óptico se pudo comprobar que la variación en el *pitch* de la red de difracción, producto de las deformaciones mecánicas, permite medir de manera sensible cambios en la presión intraocular. Además, al acoplar el modelo óptico con el mecánico, se demostró el principio de funcionamiento del dispositivo y se validó la simulación con los resultados experimentales. Se fabricó un prototipo del microsensors con las dimensiones y las características deseadas. Los resultados obtenidos de la caracterización concordaron con aquellos de la simulación. Lo anterior, permite utilizar la simulación como una herramienta rápida de rediseño por las ventajas que supone la simulación frente a la fabricación. En el futuro se contempla realizar pruebas *in vivo* en conejos y trabajar en el diseño del dispositivo.

***Preliminary study of an optic microsensors for intraocular pressure (IOP) measurement***

*Introduction.* When it comes to deciding on treatment for glaucoma patients it is vital to have accurate IOP measurements. For this purpose, availability of a device with features such as small size, good sensitivity, portability (or even implantability), biocompatibility and, in addition, the possibility of integration into a more complex system (sensing and actuating), is interesting. BioMEMS are microelectromechanical systems developed for biomedical application. Among their main features, of note are their very small size and

biocompatibility. MOEMS are systems also including optical components. This paper presents the design, simulation and fabrication of a passive optical microsensor (MOEMS) prototype for IOP measurement. This microsensor is based on changes in the optical properties of a diffraction grating that occur when an IOP rise mechanically deforms this grating. Simulation by a microsensor with these features allows to clearly understand the underlying physical principles and also unveil the key parameters in the design of this device. The prototype designed and fabricated consists of a diffraction grating of 1 [mm<sup>2</sup>] and 100 [µm] of thickness. The material used is an elastomer (PDMS) with excellent properties for this type of applications.

*Objectives.* To design a passive optical microsensor for IOP measurement; define and establish the determining parameters of this device; simulate the physical principle by which IOP is measured; fabricate a prototype of the microsensor and evaluate its operating principle; compare the results obtained with those yielded by simulation and validate the model.

*Methodology.*

- *Computational simulation:* 1) A mechanical model allowing for accurate description of the mechanical response of the material when there is an IOP rise was defined on the basis of previous investigation and experimental trials. 2) The pitch variation of the diffraction grating, a key parameter for monitoring, was calculated with the mechanical results. 3) Simulation of the mechanical part was performed using the *finite element* method with a hyperelastic material model (Mooney-Rivlin). 4) The optical part was simulated with a software for the design and analysis of optical systems, using the ray tracing technique. 5) These mechanical and optical models were coupled in order to evaluate the behavior of the microsensor.

- *Fabrication and experimental trials:* 1) The prototype with the sizes described above was implemented on the basis of the microfabrica-

tion technique known as *Soft Lithography*. The material used was PDMS. 2) The diffraction gratings thus obtained were characterized both optically and mechanically with the purpose of comparing the results of those obtained from simulation and evaluate possible redesigns.

*Results and discussion.* The results obtained from the mechanical model evidence that, in the range of interest, the model correctly describes the microsensor's diffraction grating deformation. This is of vital importance since it enables the sensor to measure IOP in the desired values (up to 2500 [Pa]). The optical model demonstrated that the diffraction grating pitch variation, occurring as a result of mechanical deformations, allows for a more sensitive measurement of IOP changes. Furthermore, the operating principle of the device was demonstrated and simulation of experimental results was validated by coupling of the optical and mechanical models. A prototype of the microsensor having the desired dimensions and features was fabricated. The results obtained from characterization are consistent with those of simulation. Therefore, simulation can be used as a rapid redesign tool due to the advantages of simulation vs. fabrication. *In vivo* trials in rabbits and further work in the design of the device will be performed in the future.

### ***Estudo preliminar de um microsensor óptico para a medição da pressão intraocular (PIO)***

*Introdução.* Na hora de realizar o tratamento de pacientes com glaucoma é fundamental contar com uma correta medição da PIO. É por isso que um dispositivo interessante para tal fim será aquele que tenha características tais como ser de pequenas dimensões, ter boa sensibilidade, ser portátil (ou até implantável), biocompatível e que, além disso, possa integrar-se em um sistema de maior complexidade (com sensor e atuador). Os BioMEMS, assim chamados por suas siglas em inglês, são sistemas micro-eleto-mecânicos desenvolvidos para

uma finalidade de aplicação biomédica. Entre suas principais características é possível mencionar suas muito pequenas dimensões e o fato de serem biocompatíveis. Os MOEMS são aqueles sistemas que incluem também componentes ópticos. Neste trabalho apresenta-se o desenho, a simulação e a fabricação de um protótipo de microssensor óptico passivo (MOEMS) para a medição da PIO. Este microssensor está baseado nas alterações das propriedades ópticas de uma rede de difração produzidas quando um aumento na PIO deforma mecanicamente a dita rede.

A simulação de um microssensor com estas características permite compreender precisamente os princípios físicos subjacentes, dando uma ideia correta daqueles parâmetros-chave no design do dispositivo. O protótipo projetado e fabricado consiste em uma rede de difração de 1 [mm<sup>2</sup>] e 100 [µm] de espessura. O material utilizado é um elastómero (PDMS) com excelentes propriedades para tais aplicações.

*Objetivos.* Projetar um microssensor óptico passivo para medir a pressão intraocular. Definir e estabelecer os parâmetros determinantes do dispositivo. Simular o princípio físico mediante o qual a PIO é medida. Fazer um protótipo microssensor e avaliar o princípio do seu funcionamento. Comparar os resultados obtidos com aqueles atingidos a partir da simulação e validação do modelo.

*Metodologia.*

• *Simulação computacional:* 1) A partir de trabalhos prévios e testes experimentais foi definido um modelo mecânico que permitisse descrever fidedignamente a resposta mecânica do material frente a um aumento da PIO. 2) Com os resultados mecânicos foi calculada a variação no *pitch* (período) da rede de difração, parâmetro chave para poder realizar o monitoramento. 3) Foi realizada a simulação da parte mecânica

utilizando o *método de elementos finitos* com um modelo de material hiperelástico (Mooney-Rivlin). 4) A parte óptica foi simulada com um *software* para design e análise de sistemas ópticos, utilizando a técnica de *ray tracing*. 5) Esses modelos (mecânico e óptico) foram acoplados com o objetivo de avaliar o comportamento do microssensor.

• *Fabricação e testes experimentais:* 1) A partir da técnica da microfabricação chamada de *Soft Lithography* foi implementado o protótipo com as dimensões anteriormente mencionadas. O material utilizado foi o PDMS. 2) As redes de difração obtidas foram caracterizadas tanto óptica quanto mecanicamente com o fim de comparar os resultados com aqueles obtidos da simulação e, assim, avaliar possíveis redesenhos.

*Resultados e discussão.* Os resultados obtidos do modelo mecânico mostram que na faixa de interesse o modelo descreve corretamente a deformação da rede de difração do microssensor. O anterior é de fundamental importância já que permite que o sensor possa medir a PIO nos valores desejados (até 2500 [Pa]). Do modelo óptico foi possível comprovar que a variação no *pitch* da rede de difração, produto das deformações mecânicas, permite medir de maneira sensível alterações na pressão intraocular. Além disso, ao acoplar o modelo óptico com o mecânico, foi demonstrado o princípio de funcionamento do dispositivo e foi validada a simulação com os resultados experimentais. Fabricou-se um protótipo do microssensor com as dimensões e as características desejadas. Os resultados obtidos da caracterização concordaram com aqueles da simulação. O anterior permite utilizar a simulação como uma ferramenta rápida de redesenho pelas vantagens que supõe a simulação frente à fabricação. No futuro se considera realizar testes *in vivo* em coelhos e trabalhar no design do dispositivo.

## Fotoqueratitis inducida con láser de argón en cobayos deficientes en ascorbato: modificaciones ultraestructurales de córnea

Suárez MF<sup>a</sup>, Suárez AC<sup>b</sup>, Maldonado C<sup>c</sup>, Monti R<sup>d</sup>, Crim N<sup>d</sup>, Espósito E<sup>d</sup>, Urrets-Zavalía JA<sup>d</sup>, Serra HM<sup>a</sup>

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

<sup>b</sup> Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba, Argentina.

<sup>c</sup> Centro de Microscopía Electrónica, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba.

<sup>d</sup> Servicio de Oftalmología, Clínica Universitaria Reina Fabiola, Universidad Católica de Córdoba.

\* Estos autores contribuyeron igualmente en este trabajo.

*Antecedentes.* La queratopatía climática esferoide (QPC) es una enfermedad degenerativa, adquirida, bilateral, asimétrica de la córnea humana, caracterizada por una progresiva pérdida de la transparencia corneal y consecuente disminución de la visión con una incidencia alta en el Departamento El Cuy de la provincia de Río Negro, Argentina. Aunque se desconocen las causas de esta enfermedad y los mecanismos moleculares involucrados en su progresión, condiciones climáticas desfavorables tales como la aridez, la sequedad ambiental y los vientos intensos que vehiculizan partículas en suspensión afectando la córnea en forma crónica han sido propuestas como factores desencadenantes. Además, deficiencias parciales en vitamina C e inadecuada protección de la córnea a radiación ultravioleta han sido postulados como otros mecanismos etiopatogénicos de QPC.

*Objetivo.* Investigar los efectos producidos por diferentes tipos de láseres (empleados frecuentemente en medicina) en la córnea de cobayos alimentados con una dieta óptima de vitamina C o con una dieta deficiente de este importante nutriente.

*Materiales y métodos.* Se probaron cuatro tipos distintos de láseres con distintas potencias (de ar-

gón, dióxido de carbono, diodo y Nd-Yag). Debido a que solamente el láser de argón no dañó el endotelio corneal (crucial estructura para el mantenimiento de la integridad de este órgano), decidimos continuar con la investigación utilizando el de uso oftalmológico (Novus 2000, Coherent) ubicado sobre una lámpara de hendidura.

Se utilizaron cobayos pigmentados siguiendo las normas para cuidado de animales de ARVO.

Los animales (n=10) fueron divididos en dos grupos: uno con dosis alta de vitamina C (2 mg/100 g peso/día) y el otro con dieta deficiente en vitamina C (0,08 mg/100 g peso/día). El ojo izquierdo de cada animal (n=10) recibió 15 disparos focalizados sobre el epitelio corneal central con una potencia de 350 mW, con un tiempo de exposición y tamaño de disparo constantes; mientras que el ojo derecho no fue tratado (controles, n=10). Las alteraciones corneales inducidas se estudiaron a los siguientes tiempos: 1 hora, 18 horas, 6 días, 8 días, 15 días y 21 días mediante métodos *in vivo*: biomicroscopía (BM, Haag Streit 900) y tomografía de coherencia óptica (OCT, Visante y Cirrus, Carl Zeiss). Luego de realizar dichos estudios los animales fueron sacrificados, las córneas extraídas y estudiadas mediante microscopía electrónica (ME) a cada uno de los tiempos indicados.

*Resultados.* En los estudios realizados mediante BM se observó la presencia de leucomas, los cuales persistieron hasta el día 15. Mediante OCT se observó un adelgazamiento del espesor corneal en los ojos tratados con láser con respecto de los controles solamente durante la primera semana. Mediante ME se observaron diferencias estructurales en epitelio y estroma corneal entre animales con dieta rica en vitamina C y aquellos con dieta deficiente.

*Conclusiones.* Fue posible desarrollar lesiones corneales en epitelio y estroma anterior de manera reproducible mediante el uso de láser de argón. Los estudios *in vivo* demostraron que las córneas lesionadas con el láser no dejaron secuelas visibles. Estos cambios ultraestructurales fueron diferentes en animales sometidos a dieta deficiente en ácido ascórbico.

### ***Argon-laser-induced photokeratitis in ascorbate-deficient guinea pigs: corneal ultrastructural changes***

**Background.** Spheroidal climatic droplet keratopathy (CDK) is an acquired, bilateral, asymmetric degenerative disease of the human cornea characterized by progressive loss of corneal transparency and a consequent decrease in vision with a high incidence rate in the Department of El Cuy, province of Rio Negro, Argentina. Though the causes of the disease and the molecular mechanisms involved in its progression remain unknown, unfavorable climatic conditions, such as aridity, dry environments and intense winds carrying airborne particles that chronically affect the cornea, have been proposed as triggering factors. Furthermore, partial vitamin C deficiencies and inadequate protection of the cornea against ultraviolet radiation have been postulated as other etiopathogenic mechanisms of CDK.

**Objective.** To investigate the effects produced by different types of lasers (usually used in Medicine) on the corneas of guinea pigs fed on a diet with optimal vitamin C levels or a diet deficient in this important nutrient.

**Materials and methods.** Four different types of lasers (argon, carbon dioxide, diode and Nd-Yag) using different powers were tested. Since the only laser not damaging the corneal endothelium (a crucial structure for maintenance of the integrity of this organ) was the argon laser, we decided to continue our investigation with the use of the one for ophthalmic practice (Novus 2000, Coherent) mounted on a slit lamp.

Pigmented guinea pigs were used according to ARVO guidelines for animal research. The animals (n = 10) were divided into two groups: one receiving a high dose of vitamin C (2 mg/100 g of weight/day) and the other one, a vitamin C-deficient diet (0.08 mg/100 g of weight/day).

The left eye of each animal (n = 10) received 15 shots directed at the central corneal epithelium at 350 mW of power, with constant exposure time

and shot size, while the right eye was left untreated (controls, n = 10). The corneal changes induced were studied at the following time-points: 1 and 18 hours and 6, 8, 15 and 21 days, by *in vivo* methods: biomicroscopy (BM, Haag Streit 900) and optical coherence tomography (OCT, Visante & Cirrus, Carl Zeiss). After these studies animals were sacrificed and corneas were removed and studied by electron microscopy (EM) at each time-point mentioned above.

**Results.** Biomicroscopic studies revealed the presence of leukomas that persisted in time until day 15. OCT revealed corneal thickness thinning in laser-treated eyes vs. controls only during the first week. EM evidenced structural differences in the corneal epithelium and stroma between animals fed on a vitamin C-rich diet and those fed on a deficient diet.

**Conclusions.** We were able to develop reproducible corneal lesions of the anterior epithelium and stroma with the use of the Argon laser. *In vivo* trials demonstrated that corneas damaged by the laser had no visible sequelae. These ultrastructural changes were different in animals receiving an ascorbic acid-deficient diet.

### ***Fotoceratite induzida com laser argônio em cobaias deficientes em ascorbato: alterações ultraestruturais na córnea***

**Antecedentes.** A ceratopatia climática esferoide (QPC) é uma doença degenerativa, adquirida, bilateral, assimétrica da córnea humana, caracterizada por uma progressiva perda da transparência corneana e consequente diminuição da visão com uma alta incidência no Departamento El Cuy, da província de Rio Negro, Argentina. Embora sejam desconhecidas as causas desta doença e os mecanismos moleculares envolvidos na sua progressão, condições climáticas desfavoráveis tais como a aridez, a seca ambiental e os ventos intensos que levam partículas em suspensão afetando a córnea em forma crônica têm sido propostas como fatores desencadeantes. Além disso, deficiências par-

ciais de vitamina C e uma inadequada proteção da córnea à radiação ultravioleta foram apresentadas como outros mecanismos etiopatogênicos de QPC.

**Objetivo.** Pesquisar os efeitos produzidos por diferentes tipos de laser (empregados frequentemente em medicina) na córnea de cobaias alimentadas com uma dieta ótima de vitamina C ou com uma dieta deficiente desse importante nutriente.

**Materiais e métodos.** Foram experimentados quatro tipos distintos de laser com diferentes potências (argônio, dióxido de carbono, dídodo e Nd-Yag). Dado que somente o laser de argônio não causou danos no endotélio corneano (estrutura crucial para a manutenção da integridade deste órgão), decidimos continuar a pesquisa utilizando o laser de uso oftalmológico (Novus 2000, Coherent) localizado sobre uma lâmpada de fenda.

Foram utilizadas cobaias pigmentadas seguindo as normas para o cuidado de animais da ARVO. Os animais (n=10) foram divididos em dois grupos: um com doses alta de vitamina C (2 mg/100 g peso/dia) e o outro com dieta deficiente em vitamina C (0,08 mg/100 g peso/dia). O olho esquerdo de cada animal (n=10) recebeu 15 disparos focalizados sobre o epitélio corneano central com uma potência de 350 mW, com um tempo de exposição e tamanho de disparo constante; no entanto, o olho direito não foi tratado (controles, n=10). As alterações corneanas induzidas foram estudadas nos seguintes tempos depois do começo do experimento: 1 hora, 18 horas, 6 dias, 8 dias, 15 dias e 21 dias mediante métodos *in vivo*: biomicroscopia (BM, Haag Streit 900) e tomografia de coerência óptica (OCT, Visante y Cirrus, Carl Zeiss). Após realizar os estudos, os animais foram sacrificados, as córneas extraídas e estudadas mediante microscopia eletrônica (ME) a cada um dos tempos indicados.

**Resultados.** Nos estudos realizados mediante BM foi observada a presença de leucomas, os quais persistiram até o dia 15. Mediante OCT observou-se um estreitamento da espessura corneana nos olhos tratados com laser se comparados com

os controles somente durante a primeira semana. Mediante ME foram observadas diferenças estruturais no epitélio e no estroma corneano entre animais com dieta rica em vitamina C e aqueles com dieta deficiente.

**Conclusões.** Foi possível desenvolver lesões corneanas no epitélio e no estroma anterior de modo reproduzível mediante o uso de laser de argônio. Os estudos *in vivo* demonstraram que as córneas lesadas com o laser não deixaram sequelas visíveis. Essas alterações ultraestruturais foram diferentes em animais submetidos a dieta deficiente em ácido ascórbico.

## Estudio de los mecanismos involucrados en el daño retinal por exposición a luz constante de baja intensidad

Benedetto MM<sup>a</sup>, Quinteros Quintana ML<sup>b</sup>, Guido ME<sup>a</sup>, Contín MA<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Centro de Investigaciones en Química Biológica de Córdoba (CI-QUIBIC)-CONICET, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

<sup>b</sup> Laboratorio de Procesamiento de Señales, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba.

Contacto: mmbenedetto@hotmail.com

La retinitis pigmentosa (RP) comprende un grupo de distrofias retinales hereditarias, caracterizadas por la degeneración progresiva de los fotorreceptores y, como consecuencia de esto, anomalías en los registros electrorretinográficos, reducción del campo visual y ceguera nocturna. Además, con el avance de la degeneración se puede producir ceguera total.

La RP es clínica, genéticamente muy heterogénea y tanto su alteración funcional como el mecanismo patológico pueden variar según cuál sea el gen afectado. En tal sentido, si la mutación se encuentra en un componente clave de la fototransducción se puede producir la activación continua

de este mecanismo, como si se estuviera en luz constante. Es decir, la luz puede imitar los efectos producidos por estas mutaciones.

Numerosos trabajos de daño retinal por luz han servido como modelos para el estudio de degeneraciones retinales que surgen a causa de insultos ambientales, envejecimiento y desórdenes genéticos.

Con el objetivo de estudiar el proceso de degeneración retinal (DR) producido por la activación constante del mecanismo de fototransducción, ratas albinas Wistar hembras de 3 meses de edad se expusieron a luz blanca fría de 200 lux de intensidad de 1 a 7 días. Los animales controles se expusieron a ciclos de luz (200 lux)/oscuridad (0 lux) de 12hs/12hs (LD) o a oscuridad constante (0 lux) (DD). Nuestros resultados muestran que la exposición de ratas albinas Wistar a luz constante ocasiona la muerte de los fotorreceptores, hecho que queda demostrado por una reducción de la capa nuclear externa con valores estadísticamente significativos a partir de los 7 días de exposición. Este fenómeno no se observa en los animales mantenidos en ciclos LD ni en aquellos mantenidos en DD. En nuestro modelo experimental la muerte de los fotorreceptores resulta más lenta que en animales expuestos a intensidades mayores a 1000 lux; lo que podría corresponder a mecanismos de muerte diferentes. Con el fin de dilucidar qué mecanismos son los responsables de la muerte de los bastones se evaluó la expresión y la actividad enzimática de caspasa 3, proteína implicada en el proceso de muerte celular programada conocido como apoptosis. Los resultados revelaron que ambos parámetros estudiados no se modifican a lo largo de los días de exposición a luz, es decir, la muerte es caspasa 3-independiente.

Además de estudiar el mecanismo de muerte, se analizó la expresión de rodopsina. Los resultados mostraron que la misma no se encuentra alterada; sin embargo sí hay más proporción de rodopsina fosforilada desde tiempos cortos de estimulación. En conclusión, en nuestro modelo experimental, la exposición constante a luz blanca fría de 200 lux

de intensidad produce DR como consecuencia de la muerte de bastones.

### ***Mechanisms involved in retinal injury induced by constant low-intensity light exposure***

Retinitis pigmentosa (RP) encompasses a set of hereditary retinal dystrophies characterized by progressive photoreceptor degeneration, and, consequently, abnormalities in electroretinographic responses, visual field reduction and night blindness. In addition, with progression of degeneration, total blindness can occur.

RP is clinical, genetically very heterogeneous, and both its functional alteration and pathologic mechanism can vary according to the gene affected. In this regard, if the mutation is in a key component of phototransduction, continuous activation of this mechanism can occur, as if in the presence of constant light, i.e. light can mimic the effects produced by these mutations.

Many papers on retinal damage caused by light have been used as models for the study of retinal degenerations occurring as a consequence of environmental insults, ageing and genetic disorders.

With the purpose of studying the process of retinal degeneration (RD) produced by constant activation of the phototransduction mechanism, 3-month-old female Wistar albino rats were exposed to cold white light of 200 lux of intensity from 1 to 7 days. Control animals were exposed to light cycles (200 lux)/dark (0 lux) of 12 h/12 h (LD) or to constant dark (0 lux) (DD). Our results evidence that exposure of Wistar albino rats to constant light produces photoreceptor death, as demonstrated by a reduction in the outer nuclear layer with statistically significant values as from 7 days of exposure. This phenomenon is not observed in animals kept on LD cycles or in those on DD. In our experimental model of photoreceptor death this process is slower than in animals exposed to intensities over 1000 lux and this might be accounted for by different death me-



chanisms. With the purpose of elucidating which the mechanisms responsible for rods death are, the expression and enzymatic activity of caspase 3, a protein involved in the process of programmed cell death known as apoptosis, was evaluated. Results revealed that both parameters studied remain unchanged throughout the days of light exposure, i.e. death is non-caspase 3-dependent.

In addition to studying the mechanism of death, rhodopsin expression was analyzed. Results evidenced that it is not altered; however, there is a higher rate of phosphorylated rhodopsin as from early stimulation times. It may be concluded that in our experimental model, constant exposure to cold white light of 200 lux of intensity produces RD as a consequence of rods death.

### ***Estudo dos mecanismos envolvidos no dano retiniano por exposição à luz constante de baixa intensidade***

A retinite pigmentar (RP) compreende um grupo de distrofias retinianas hereditárias, caracterizadas pela degeneração progressiva dos fotorreceptores e, como consequência disso, anormalidades nos registros eletrorretinográficos, redução do campo visual e cegueira noturna. Além disso, com o avanço da degeneração pode se produzir cegueira total.

A RP é clínica, geneticamente muito heterogênea e, tanto sua alteração funcional quanto a mecanismo patológico podem variar segundo qual for o gene afetado. Nesse sentido, se a mutação está em um componente chave da fototransdução pode produzir a ativação continua desse mecanismo, como se estiver em situação de luz constante. Isto é, a luz pode imitar os efeitos produzidos por essas mutações.

Numerosos trabalhos de dano retiniano por luz têm servido como modelos para o estudo de degenerações retinianas que surgem por causa de

insultos ambientais, envelhecimento e distúrbios genéticos.

Com o objetivo de estudar o processo de degeneração retiniano (DR) produzido pela ativação constante do mecanismo de fototransdução, fêmeas de ratos albinos Wistar de três meses de idade foram expostas à luz branca fria de 200 lux de intensidade de 1 a 7 dias. Os animais controle foram expostos a ciclos de luz (200 lux)/escuridão (0 lux) de 12hs/12hs (LD) o a escuridão constante (0 lux) (DD). Nossos resultados mostram que a exposição de ratos albinos Wistar à luz constante produz a morte dos fotorreceptores, fato que fica demonstrado por uma redução da camada nuclear externa com valores estatisticamente significativos a partir dos sete dias de exposição. Esse fenômeno não é observado nos animais mantidos em ciclos LD nem naqueles mantidos em DD. No nosso modelo experimental a morte dos fotorreceptores resulta mais lenta que em animais expostos a intensidades maiores a 1000 lux. Isso poderia corresponder a mecanismos de morte diferentes. Com o fim de dilucidar quais são os mecanismos responsáveis da morte dos bastonetes foi avaliada a expressão e a atividade enzimática de caspase 3, proteína envolvida no processo de morte celular programada conhecido como apoptose. Os resultados revelaram que ambos os parâmetros estudados não se modificam ao longo dos dias de exposição à luz, isto é, a morte é caspase 3-independente.

Além de estudar o mecanismo de morte, foi analisada a expressão de rodopsina. Os resultados mostraram que a mesma não está alterada; porém existe maior proporção de rodopsina fosforilada a partir de tempos curtos de estimulação. Concluindo, no nosso modelo experimental, a exposição constante à luz branca fria de 200 lux de intensidade produz DR como consequência da morte de bastonetes.

## Cultivos primarios de retina de pollo altamente enriquecidos en células horizontales expresan el fotopigmento melanopsina X

Morera LP, Díaz NM, Guido ME

Centro de Investigaciones en Química Biológica de Córdoba (CIQUIBIO)-CONICET, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

Contacto: luis.p.morera@gmail.com

*Antecedentes y objetivos.* Las células ganglionares de la retina (CGR) que expresan el fotopigmento melanopsina (OPN4) son intrínsecamente fotosensibles. En la retina de pollo se describieron dos genes de OPN4, *Opn4x* y *Opn4m*. Se demostró que la expresión de *Opn4m* se limita solo a la capa de CGRs, mientras que *Opn4x* cambia a lo largo del desarrollo: al día embrionario 8 (E8) se limita a la capa en formación de CGRs y al nervio óptico, mientras que a partir del E15 aparece principalmente en células horizontales (HCs). El objetivo de este trabajo fue purificar las HCs de la retina de pollo, obtener cultivos primarios altamente enriquecidos en estas células y caracterizarlos.

*Métodos.* Se disgregaron retinas de embriones de pollo de E15 y se sometieron a un gradiente discontinuo de 1 al 4% de albúmina de suero bovino (BSA). Las células recolectadas de las diferentes fases se cultivaron durante 4 días y se caracterizaron por inmunoquímica y morfología celular. Las fases se examinaron con anticuerpos específicos contra *Opn4x*, marcadores de HCs (PROX-1, Islet-1, calretinina) y marcadores para otras poblaciones de células de la retina. Además la expresión de Prox-1 en la retina se determinó por citometría de flujo. Finalmente los cultivos primarios se analizaron por RT-PCR.

*Resultados.* Sólo la fracción del gradiente correspondiente al 2,5% de BSA contuvo el mayor porcentaje de HCs. Basados en un detallado análisis morfológico se encontró que las células de

esta fracción se asemejan a HCs tipo H1 y H3. La inmunoreactividad de *Opn4x* se observó en los cultivos de las células provenientes tanto de la fase 2,5 como de la del 3% de BSA. Es de destacar que la fase 3% contiene células que expresan el filamento neuronal de 200 kDa (NF200) y presentan procesos que se asemejan morfológicamente a los de las CGRs. El análisis por citometría de flujo demostró que un 30% de las células en el disgregado de retina total y un 80% de las células de la fase 2,5% presentan marca Prox-1 (+). El análisis por RT-PCR evidenció la presencia de transcritos correspondientes a marcadores específicos de HCs.

*Conclusiones.* Por medio de este método separamos selectivamente HCs y logramos cultivos altamente enriquecidos en estas células que expresan el fotopigmento OPN4x.

*Subsidios.* Financiado por ANPCyT-FONCyT PICT Bicentenario 2010 Nr. 647, PICT, CONICET, SeCyT-UNC, y MinCyT de Córdoba.

### *Highly enriched primary cultures of chicken retinal horizontal cells express the photopigment melanopsin X*

*Background and objectives.* Retinal ganglion cells (RGCs) expressing the photopigment melanopsin (OPN4) are intrinsically photosensitive. Two OPN2 genes, *opn4x* and *Opn4m*, have been described in the chicken retina. It has been demonstrated that the expression of *Opn4m* is restricted to the RGC layer, while *Opn4x* changes throughout development: on embryonic day 8 (E8) it is limited to the RGC layer in formation and to the optic nerve, while as from E15 it appears mainly in horizontal cells (HCs).

The purpose of this paper was to purify HCs from the chicken retina, obtain highly enriched primary cultures in these cells and characterize them.

*Methods.* Embryonic chicken retinas at E15 were disaggregated and subjected to a discontinuous 1 to 4% bovine serum albumin (BSA) gradient. Cells from the different phases were cultured for 4

days and characterized by immunohistochemistry and cell morphology. Phases were examined with Opn4x-specific antibodies, HC markers (Prox-1, Islet-1, calretinin) and markers for other retinal cell populations. In addition, Prox-1 expression in the retina was determined by flow cytometry. Finally, primary cultures were analyzed by RT-PCR.

*Results.* Only the 2.5% BSA gradient phase contained the greatest percentage of HCs. Based on a detailed morphological analysis, it was found that cells from this fraction are similar to HCs type H1 and H3. Opn4x immunoreactivity was observed in cultures of cells from both the 2.5 and 3% BSA gradient phases. Strikingly, the 3% phase contains cells that express the neuronal filament 200 kDa (NF200) and present processes that morphologically resemble those of RGCs. Flow cytometric analysis revealed that 30% of cells from the whole disaggregated retina and 80% from the 2.5% BSA gradient phase cells were Prox-1(+). RT-PCR analysis evidenced the presence of transcripts corresponding to HC-specific markers.

*Conclusions.* By this method we have been able to selectively separate HCs and to obtain highly enriched cultures in these cells that express the OPN4x photopigment.

### ***Culturas primárias de retina de frango altamente enriquecidas em células horizontais expressam o fotopigmento melanopsina X***

*Antecedentes e objetivos.* As células ganglionares da retina (CGR) que expressam o fotopigmento melanopsina (OPN4) são intrinsecamente fotosensíveis. Na retina de frango foram descritos dois genes de OPN4, Opn4x e Opn4m. Foi demonstrado que a expressão de Opn4m se limita apenas à camada de CGRs, enquanto o Opn4x muda ao longo do desenvolvimento: no dia embrionário 8 (E8) se limita à camada em formação de CGRs e

ao nervo óptico, enquanto a partir do E15 aparece principalmente em células horizontais cultivos primário (HCs). O objetivo desse trabalho foi purificar as HCs da retina de frango, obter culturas primárias altamente enriquecidas nestas células e caracterizá-las.

*Métodos.* Foram desagregadas retinas de embriões de frango de E15 e foram submetidas a um gradiente descontínuo de 1 a 4% albumina sérica bovina (BSA). As células colhidas das diferentes fases foram cultivadas durante quatro dias e se caracterizaram por imunoquímica e morfologia celular. As fases foram examinadas com anticorpos específicos contra Opn4x, marcadores de HCs (PROX-1, Islet-1, calretinina) e marcadores para outras populações de células da retina. Além disso, a expressão de Prox-1 na retina foi determinada por citometria de fluxo. Finalmente as culturas primárias foram analisadas por RT-PCR.

*Resultados.* Apenas a fração do gradiente correspondente a 2,5% de BSA conteve a maior percentagem de HCs. Baseados em uma detalhada análise morfológica encontramos que as células desta fração se assemelham a HCs tipo H1 e H3. A imunoreatividade de Opn4x foi observada nas culturas das células provenientes tanto da fase 2,5 quanto da de 3% de BSA. É preciso destacar que a fase 3% contém células que expressam o filamento neuronal de 200 kDa (NF200) e apresentam processos que se assemelham morfológicamente aos das CGRs. A análise por citometria de fluxo demonstrou que 30% das células na desagregação de retina total e 80% das células da fase 2,5% apresentam marca Prox-1 (+). A análise por RT-PCR evidenciou a presença de transcritos correspondentes a marcadores específicos de HCs.

*Conclusões.* Mediante este método separamos seletivamente HCs e conseguimos culturas altamente enriquecidas nestas células que expressam o fotopigmento OPN4x.

## Evaluación *in vivo* de diversas plataformas tecnológicas de liberación de fármacos con potencial utilización en el tratamiento del glaucoma

Tártara I<sup>a</sup>, Battistini FD, Allemandi D, Palma S.

<sup>a</sup>Unidad de Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología Farmacéutica (UNITEFA-CONICET). Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba.  
Contacto: i.tartara@gmail.com

**Introducción.** Uno de los objetivos principales del diseño de nuevas plataformas tecnológicas de liberación de fármacos (PTLF) en oftalmología es aumentar el tiempo de permanencia de la formulación en el sitio de aplicación, incrementando el tiempo de contacto del fármaco con la córnea u otro tejido y reduciendo su tasa de eliminación; por lo tanto, favoreciendo la absorción.

En el tratamiento convencional del glaucoma se utilizan agentes hipotensores que deben permear a través de la córnea y actuar (fenómenos de farmacocinética y farmacodinamia).

**Objetivo.** Evaluar *in vivo* (conejos) la eficacia de nuevas plataformas para la vehiculización de fármacos utilizados en el glaucoma.

**Metodología.** Puesta a punto de protocolos de estudios de irritación ocular, tiempo de permanencia de los sistemas en la superficie ocular y medición de la presión intraocular (PIO) en animales (conejos). PTLF evaluadas: films de ácido hialurónico (FAH-TM); film constituido por proteína de soja entrecruzados con genipina (SPI-TM); gel de ácido hialurónico (GAH-TM) y microemulsiones (ME-TM), todos conteniendo maleato de timolol (TM) como fármaco modelo.

**Resultados.** Irritación ocular: no se observa irritación en GAH-TM ni en SPI-TM. FAH-TM y ME-TM presentaron irritación leve a moderada. El tiempo de permanencia para SPI-TM fue de 72 horas y para FAH-TM, de 24 horas. En el caso de

los geles y microemulsiones se observó un tiempo de permanencia superior que la solución control, pero no superior a una hora. Para la medición de la PIO todos los sistemas obtuvieron un descenso entre el 15 y el 30% y el pico se observó entre las 2 y 4 horas de aplicación.

**Conclusión.** Las PTLF estudiadas demostraron ser eficaces como hipotensores, con nula a moderada irritación en la superficie ocular según la plataforma empleada. Con respecto del tiempo de permanencia, los films se mantuvieron en el sitio de aplicación por mayor tiempo que las formulaciones líquidas.

## *In vivo* evaluation of several technological platforms for drug release with potential use in glaucoma treatment

**Introduction.** One of the main objectives of the design of new drug delivery technological platforms (DDTP) in ophthalmology is to increase the formulation's retention time into its application site, thus increasing time of exposure of the cornea or other tissue with the drug and reducing its elimination rate, with the consequent better absorption.

Hypotensive agents that must permeate across the cornea and exert their effect (pharmacokinetic and pharmacodynamic phenomena) are used in conventional treatment of glaucoma.

**Objective.** To evaluate the *in vivo* (rabbits) efficacy of new platforms for vehiculization of drugs used in glaucoma.

**Methodology.** Fine tuning of study protocols of ocular irritation, system's retention time on the ocular surface and intraocular pressure (IOP) measurement in animals (rabbits). DDTP evaluated: hyaluronic acid films (HAF-TM); films composed of soybean protein crosslinked with genipin (SBG-TM), hyaluronic acid gel (HAG-TM) and microemulsions (ME-TM), all containing timolol maleate (TM) as the model drug.

**Results.** Ocular irritation: no irritation was observed with HAG-TM and SBG-TM, while

HAF-TM and ME-TM produced mild to moderate irritation. Retention time for SBG-TM was 72 hours and for HAF-TM, 24 hours. In the case of gels and microemulsions, retention time was longer than with the control solution, but not longer than one hour. As regards IOP measurement, with all systems there was a decrease between 15 and 30%, and the peak was observed between 2 and 4 hours of application.

**Conclusion.** The DDTP studied demonstrated hypotensive efficacy, with null or moderate irritation of the ocular surface depending on the platform used. As regards retention time, films remained in their application site longer than liquid formulations.

### ***Avaliação in vivo de diversas plataformas tecnológicas de liberação de fármacos com potencial utilização no tratamento do glaucoma***

**Introdução.** Um dos objetivos principais do design de novas plataformas tecnológicas de liberação de fármacos (PTLF) em oftalmologia é aumentar o tempo de permanência da formulação no lugar de aplicação, incrementando o tempo de contato do fármaco com a córnea ou outro tecido e reduzindo sua taxa de eliminação; por conseguinte, favorecendo a absorção.

No tratamento convencional do glaucoma se utilizam agentes hipotensores que devem permear através da córnea e agir (fenômenos de farmacocinética e farmacodinâmica).

**Objetivo.** Avaliar *in vivo* (coelhos) a eficácia de novas plataformas para a veiculação de fármacos utilizados no glaucoma.

**Metodologia.** Preparação de protocolos de estudos de irritação ocular, tempo de permanência dos sistemas na superfície ocular e medição da pressão intraocular (PIO) em animais (coelhos). PTLF avaliadas: películas de ácido *hialurônico* (FAH-TM); película constituída por proteína de soja reticuladas com genipina (SPI-TM); gel de ácido *hialurônico* (GAH-TM) e *microemulsões* (ME-

TM), todos contendo maleato de timolol (TM) como fármaco modelo.

**Resultados.** Irritação ocular: não se observa irritação no caso do GAH-TM nem em SPI-TM. FAH-TM; e ME-TM apresentaram irritação leve a moderada. O tempo de permanência para SPI-TM foi de 72 horas e para FAH-TM, de 24 horas. No caso dos geles e *microemulsões* se observou um tempo de permanência superior que para a solução controle, mas não superior a uma hora. Para a medição da PIO todos os sistemas obtiveram um descenso de entre 15 e 30% e o topo foi observado entre as duas e quatro horas de aplicação.

**Conclusão.** As PTLF estudadas demonstraram ser eficazes como hipotensores, com uma irritação entre nula e moderada na superfície ocular segundo a plataforma empregada. Quanto ao tempo de permanência, as películas se mantiveram no lugar de aplicação por um tempo maior que nas formulações líquidas.

### **Preparación y evaluación de nanopartículas de albúmina sérica humana estabilizadas con gantrez ES425 para su potencial uso en el tratamiento de glaucoma**

Boiero C, Tártara I, Allemandi D, Llabot JM

Unidad de Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología Farmacéutica (UNITEFA-CONICET). Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba. *Contacto:* caroboiero@gmail.com

**Introducción.** La aplicación tópica sobre la superficie del ojo es una ruta común de administración de medicamentos; sin embargo, la fisiología del ojo en sí hace que sea difícil de lograr concentraciones eficaces de fármaco durante períodos de tiempo prolongados. Es por esto que el desarrollo de nuevos sistemas portadores de fármacos oftálmicos (SPFO) que puedan superar estas barreras supone un gran avance en la terapéutica oftálmica.

Los sistemas nanométricos (NPs) han surgido como vehículos adecuados para la administración oftálmica de fármacos, ya que en muchos casos se ha observado un aumento significativo de su biodisponibilidad. Son numerosas las sustancias (polímeros sintéticos o naturales) que pueden ser utilizadas como materia prima para la preparación de Nps. En este trabajo en particular se utilizó albúmina sérica humana (ASH) para la obtención de NPs para la administración tópica de maleato de timolol (TM) para el tratamiento de glaucoma y se evaluó la utilización de un nuevo agente estabilizante de las Nps.

*Objetivos.* 1) Obtención de sistemas nanoparticulados de ASH con timolol maleato. 2) Utilización de un nuevo estabilizante de superficie para la obtención de Nps estables.

*Metodología.* Las NPs se obtuvieron por el método de desolvatación (simple y escalable) y para obtener sistemas estables se estabilizaron con un agente entrecruzante de superficie. En el presente trabajo se evaluó un nuevo agente entrecruzante (gantrez ES-425) y se compararon los resultados con Nps estabilizadas con glutaraldehído, agente utilizado generalmente para la obtención de Nps de ASH. La utilización de un nuevo agente entrecruzante es muy beneficioso debido a las reconocidas propiedades irritantes del glutaraldehído. Las Nps obtenidas con ambos estabilizantes se caracterizaron en cuanto a tamaño de partícula, índice de polidispersidad (*light scattering*), potencial zeta, rendimiento del proceso de fabricación (gravimetría, HPLC y UV), eficacia de encapsulación (HPLC) y eficacia *in vivo* mediante la determinación de la disminución de presión intraocular (PIO) en conejos normotensos. A su vez se compararon con la formulación comercial (Zopirol).

*Resultados y discusión.* Los sistemas formulados, estabilizados con gantrez o glutaraldehído (NPs) presentan tamaño ( $255,31 \pm 3,30$ ) e índice de polidispersidad ( $0,133 \pm 0,015$ ) adecuados y similares. La diferencia es que las Nps estabilizadas con glutaraldehído presentan potencial zeta positivo ( $12,11 \pm 3,1$ ), mientras que las Nps con gantrez,

un potencial zeta negativo ( $-27,87 \pm 9,55$ ). Ambos sistemas son estables en cuanto a variación de tamaño. Se pudo observar que el rendimiento del proceso es aproximadamente de un 90% y la eficacia de encapsulación de TM de 30%, en ambos sistemas ( $16,25 \pm 1,5$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  proteína). Estudios en conejos mostraron una disminución estadísticamente significativa del 25% de la PIO durante las primeras dos horas con una tendencia que se mantiene luego de 8 horas.

*Conclusión.* Si bien los resultados obtenidos son preliminares, indican que las NPs de HSA obtenidas entrecruzadas con gantrez son candidatos promisorios para la administración tópica de TM para el tratamiento de glaucoma.

### ***Preparation and evaluation of human serum albumin nanoparticles stabilized with gantrez ES425 for potential use in glaucoma treatment***

*Introduction.* Topical application on the ocular surface is a common administration route for drugs; however, the physiology of the eye *per se* makes it difficult to achieve efficacious drug concentrations over long periods. Therefore, development of new ophthalmic drug carrier systems (ODCS) able to overcome these barriers is a great advance in ophthalmic therapeutics. Nanometric systems (NPs) have emerged as adequate vehicles for ophthalmic drug administration, since in many cases, a significant increase in their bioavailability has been observed. There are many substances (synthetic or natural polymers) that may be used as raw material for NP preparation. In this study specifically, human serum albumin (HSA) was used for obtainment of NPs for topical administration of timolol maleate (TM) for the treatment of glaucoma, and the use of a new NP stabilizing agent was evaluated.

*Objectives.* 1) Obtainment of HSA nonoparticulated systems with timolol maleate. 2) Use of a new surface stabilizer for obtainment of stable NPs.

*Methodology.* NPs were obtained using a desolvation method (simple and scalable) and to achieve stable systems, they were stabilized with a surface crosslinking agent. A new surface crosslinking agent (gantrez ES-425) was evaluated in this study and results were compared with those of NPs stabilized with glutaraldehyde, an agent generally used to obtain HSA NPs. Use of a new crosslinking agent is highly beneficial because of the recognized irritating properties of glutaraldehyde.

The NPs obtained with both stabilizers were characterized in terms of particle size, polydispersity index (light scattering), zeta potential, performance of the fabrication process (gravimetry, HPLC and UV), encapsulation efficacy (HPLC) and *in vivo* efficacy by means of intraocular pressure (IOP) decrease determination in normotensive rabbits. In addition, they were compared with the formulation available in the market (Zopiro).l).

*Results and discussion.* Formulated systems stabilized with gantrez or glutaraldehyde (NPs) have adequate and similar size ( $255.31 \pm 3.30$ ) and polydispersity index ( $0.133 \pm 0.015$ ). The differences lie in the fact that NPs stabilized with glutaraldehyde have positive zeta potential ( $12.11 \pm 3.1$ ) while NPs with gantrez, have negative zeta potential ( $-27.87 \pm 9.55$ ). Both systems are stable in terms of size variation. The process had a performance near 90% and the encapsulation efficacy of TM was 30% in both systems ( $16.25 \pm 1.5$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  protein). Studies in rabbits evidenced a statistically significant reduction of 25% in IOP during the first two hours with a trend that is maintained after 8 hours.

### ***Preparação e avaliação de nanopartículas de albumina sérica humana estabilizadas com gantrez ES425 para potencial uso no tratamento de glaucoma***

*Introdução.* A aplicação tópica sobre a superfície do olho é uma via comum de administração de medicamentos; porém, a fisiologia do olho faz com que seja difícil atingir concentrações eficazes

de fármaco durante períodos de tempo prolongados. É por isso que o desenvolvimento de novos sistemas portadores de fármacos oftálmicos (SPFO) que possam superar essas barreiras supõe um grande avanço na terapêutica oftálmica.

Os sistemas nanométricos (NPs) surgiram como veículos adequados para a administração oftálmica de fármacos, já que em muitos casos observou-se um aumento significativo de sua biodisponibilidade. São numerosas as substâncias (polímeros sintéticos ou naturais) que podem ser utilizadas como matéria prima para a preparação de Nps. Neste trabalho em particular foi utilizada albumina sérica humana (ASH) para a obtenção de NPs para administração tópica de maleato de timolol (TM) para o tratamento de glaucoma e foi avaliada a utilização de um novo agente estabilizante das Nps.

*Objetivos.* 1) Obtenção de sistemas nanoparticulados de ASH com timolol maleato. 2) Utilização de um novo estabilizante de superfície para a obtenção de Nps estáveis.

*Metodologia.* As NPs foram obtidas pelo método de *desolvatação* (simples e escalável) e para obter sistemas estáveis foram estabilizados com um agente entrecruzador de superfície. No presente trabalho foi avaliado um novo agente entrecruzador (gantrez ES-425) e os resultados foram comparados com Nps estabilizadas com *glutaraldeído*, agente utilizado geralmente para a obtenção de Nps de ASH. A utilização de um novo agente entrecruzador é muito benéfico pelas reconhecidas propriedades irritantes do *gutalardeído*.

As Nps obtidas com ambos os estabilizantes foram caracterizados conforme o tamanho de partícula, índice de polidispersidade (*light scattering*), potencial zeta, rendimento do processo de fabricação (análise gravimétrica, HPLC e UV), eficácia de encapsulação (HPLC) e eficácia *in vivo* mediante a determinação da diminuição de pressão intraocular (PIO) em coelhos normotensos. Ao mesmo tempo, foram comparados com a formulação comercial (Zopiro).l).

*Resultados e discussão.* Os sistemas formulados, estabilizados com gantrez ou gutalardeído (NPs)

apresentam tamanho (255,31+/-3,30) e índice de polidispersidade (0,133+/-0,015) adequados e semelhantes. A diferença é que as Nps estabilizadas com gutaraldeído apresentam potencial zeta positivo (12,11+/- 3,1), enquanto as Nps com gantrez têm um potencial zeta negativo (-27,87+/-9,55). Ambos os sistemas são estáveis quanto à variação de tamanho. Foi possível observar que o rendimento do processo é aproximadamente de 90% e a eficácia de encapsulação de TM de 30%, em ambos os sistemas (16,25+/-1,5 µg/mg proteína). Estudos em coelhos mostraram uma diminuição estatisticamente significativa de 25% da PIO durante as primeiras duas horas com uma tendência que se mantém após 8 horas.

**Conclusão.** Embora os resultados obtidos sejam preliminares, indicam que as NPs de HSA obtidas da reticulação com gantrez são candidatos promissores para a administração tópica de TM para o tratamento de glaucoma.

## Efectividad y costos del uso de anti-VEGF en el tratamiento de la degeneración macular asociada con la edad en la práctica clínica argentina

Real JP<sup>a</sup>, Urrets-Zavalía JA, Luna JD, Juárez CP, Palma SD, Granero G

<sup>a</sup>Unidad de Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología Farmacéutica (UNITEFA-CONICET). Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba. *Contacto:* jpreal@fcq.unc.edu.ar

**Introducción.** La degeneración macular asociada con la edad (DMAE) es una de las principales causas de ceguera irreversible en el mundo, siendo las complicaciones neovasculares sus responsables en un 90%. A pesar de esto los tratamientos en base de anticuerpos monoclonales anti-VEGF han demostrado en ensayos clínicos excelentes resultados en su tratamiento, logrando que más del 90% de los pacientes conserve su visión al cabo de dos años. Sin embargo, existen factores como la accesibilidad o la adherencia a las recomendaciones, que pueden condicionar la efectividad de los mismos, generando diferencias entre lo observado en los ensayos clínicos y lo obtenido en la práctica clínica.

**Objetivo.** Evaluar los costos y la efectividad clínica del uso de ranibizumab (RNB) y bevacizumab (BVZ) en el tratamiento de la DMAE.

**Metodología.** Se realizó un estudio longitudinal retrospectivo, valorando la totalidad de casos (105 ojos, 83 pacientes) que, con un diagnóstico confirmado de DMAE y sin antecedentes de tratamientos previos, iniciaron tratamiento con RNB o BVZ en uno de los tres centros seleccionados, durante el período comprendido entre enero de 2009 y diciembre de 2012. Los cambios de AV a lo largo del tiempo y la durabilidad de los pacientes en el tratamiento fueron evaluados como variables de efectividad. Para la determinación de los costos se realizó un microcosteo (*bottom-up*) desde la perspectiva del financiador.

**Resultados.** Si bien al año de tratamiento los pacientes tratados con BVZ obtenían significativamente mejores resultados terapéuticos que los pacientes con RNB (-0,91 vs -8,98 letras de cambio, respectivamente), esta diferencia se pierde hacia el segundo año (-7,9 vs -9,74). La relajación o falta de adherencia a los controles poscarga que se observa en una disminución progresiva en el número de consultas promedio (de 6 en el primer semestre a 1,95 en el cuarto). Al utilizar la técnica de supervivencia de Kaplan Meir se observaron diferencias significativas en la durabilidad promedio de los pacientes de ambas cohortes (740 días para BVZ y 440 días para RNB). El costo promedio por paciente tras dos años de seguimiento fue de \$61.956 para el RNB contra \$31.321 con BVZ.

**Discusión.** El uso de BVZ permite conservar la AV de los pacientes por más tiempo que el RNB, consumiendo el 50% de los necesarios para utilizar este último. Sin embargo, la falta de adherencia los controles y las dosis conduce a obtener a largo plazo los mismos resultados en ambas cohortes, los cuales son superiores a no intervenir, pero por debajo de los estándares esperados.



### ***Effectiveness and costs of anti-VEGF use in the treatment of age-related macular degeneration in clinical practice in Argentina***

*Introduction.* Age-related macular degeneration (ARMD) is one of the leading causes of irreversible blindness worldwide, and neovascular complications are responsible for it in 90% of cases. In spite of this, therapy based on anti-VEGF monoclonal antibodies has evidenced excellent results in its treatment, with more than 90% of patients preserving their vision after two years. However, there are factors such as accessibility and compliance with recommendations that may condition their effectiveness, thus generating differences between the observations made in clinical trials and results in clinical practice.

*Objective.* To evaluate costs and clinical effectiveness of ranibizumab (RNB) and bevacizumab (BVZ) in the treatment of ARMD.

*Methodology.* We conducted a retrospective longitudinal trial evaluating all treatment-naive (105 eyes, 83 patients) cases with confirmed diagnosis of ARMD started on therapy with RNB or BVZ in one of the three selected centers between January 2009 and December 2012.

VA changes over time and treatment durability were evaluated as efficacy outcome measures. For costs evaluation, bottom-up costing from the payer's perspective was used.

*Results.* Though after one year of therapy patients on BVZ had derived significantly better results from treatment than those receiving RNB (-0.91 vs. -8.98 letters of change, respectively), this difference had been lost by year two (-7.9 vs. -9.74). Relaxation or failure to comply with postload visits is reflected by progressive reduction of the average number of follow-up visits (from 6 during the first semester to 1.95 over the fourth). Kaplan Meier survival analysis revealed significant differences in the average durability of patients on therapy in both cohorts (740 days for BVZ and 440 days for RNB). The average cost per patient

after two years of follow-up was \$ 61,956 (Argentine pesos) for RNB vs. \$ 31,321 with BVZ.

*Discussion.* With BVZ patients preserve their VA longer than with RNB, with an expenditure of 50% vs. the latter. However, lack of compliance with follow-up visits and with doses lead to the same long-term results in both cohorts, which are superior to non-intervention, but below the expected standards.

### ***Efetividade e custos do uso de anti-VEGF no tratamento da degeneração macular relacionada com a idade na prática clínica argentina***

*Introdução.* A degeneração macular relacionada com a idade (DMRI) é uma das principais causas de cegueira irreversível no mundo, sendo as complicações neovasculares as responsáveis por 90% dos casos. Apesar disso, os tratamentos à base de anticorpos monoclonais anti-VEGF demonstraram excelentes resultados em ensaios clínicos para seu tratamento, conseguindo que mais de 90% dos pacientes conserve sua visão ao cabo de dois anos. No entanto, existem fatores como a acessibilidade ou a aderência às recomendações, que podem condicionar a efetividade dos mesmos, gerando diferenças entre o observado nos ensaios clínicos e o obtido na prática clínica.

*Objetivo.* Avaliar os custos e a efetividade clínica do uso de ranibizumab (RNB) e bevacizumab (BVZ) no tratamento da DMRI.

*Metodologia.* Foi realizado um estudo longitudinal retrospectivo, avaliando a totalidade de casos (105 olhos, 83 pacientes) que, com um diagnóstico confirmado de DMRI e sem antecedentes de tratamentos prévios, iniciaram tratamento com RNB ou BVZ em um dos três centros selecionados, durante o período compreendido entre janeiro de 2009 e dezembro de 2012.

As alterações de AV ao longo do tempo e a durabilidade dos pacientes no tratamento foram avaliadas como variáveis de efetividade. Para a determinação dos custos foi realizada uma estimativa

de baixo para cima (*bottom-up*) da perspectiva do financiador.

**Resultados.** Embora após um ano de tratamento os pacientes tratados com BVZ obtinham significativamente melhores resultados terapêuticos do que os pacientes com RNB (-0,91 vs -8,98 letras de câmbio, respectivamente), essa diferença é perdida para o segundo ano (-7,9 vs -9,74). O relaxamento ou falta de aderência aos controles *pós-carga* observada em uma diminuição progressiva na média de consultas (de seis no primeiro semestre para 1,95 no quarto). Ao utilizar a técnica de sobrevivência de Kaplan Meir foram observadas diferenças significativas na durabilidade média dos pacientes de ambas as coortes (740 dias para BVZ e 440 dias para RNB). O custo médio por paciente depois de dois anos de acompanhamento foi de \$ 61.956 (pesos argentinos) para o RNB vs \$ 31.321 (pesos argentinos) com BVZ.

**Discussão.** O uso de BVZ permite conservar a AV dos pacientes por mais tempo do que o RNB, consumindo 50% do necessário para utilizar este último. Contudo, a falta de aderência aos controles e as doses levam a obter, no longo prazo, os mesmos resultados em ambas as coortes, superiores à não intervenção, mas, abaixo dos padrões esperados.

## Evaluación computacional del aumento de temperatura en tejidos adyacentes a implante ocular alimentado inalámbricamente

Schaumburg F<sup>a</sup>, Guarnieri FA<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Laboratorio de BioMEMS, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Entre Ríos (UNER), Oro Verde, Entre Ríos.

<sup>b</sup> Centro de Investigación de Métodos Computacionales (CI-MEC-CONICET), Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina.

Contacto: schauburg.f@gmail.com

**Introducción.** En el marco del tratamiento del glaucoma se propone un implante activo alimen-

tado de forma inalámbrica a través de un acople de radiofrecuencia (RF). Este acople se produce entre una antena interna al implante y otra incluida en un dispositivo externo, llamado escáner de RF. La transferencia de energía de forma inalámbrica implica la exposición del paciente a un campo electromagnético (CEM) que puede producir efectos térmicos (aumento de temperatura  $\Delta T$ ) y no térmicos (ejemplo: estímulos indeseados al sistema nervioso). A la frecuencia de trabajo del implante (13.56 MHz), el estudio de la interacción entre el CEM y los tejidos debe realizarse en términos del índice absorción específico (SAR) y  $\Delta T$ . Concretamente, se debe cumplir: SAR < 2 W/kg y  $\Delta T$  < 1°C. En la práctica resulta dificultoso, sino imposible, cuantificar *in vivo* el SAR. Las mediciones experimentales requieren de instrumental específico que sólo aporta información sobre fantomas. Además, es posible cuantificar  $\Delta T$  *in vivo* con relativa facilidad en la superficie del sujeto implantado, aunque no en el interior. Por otro lado, la simulación computacional brinda información de las dos cantidades físicas nombradas, con mayor grado de detalle, en toda la geometría estudiada y sin necesidad de instrumental de laboratorio específico. Como desventaja, para aportar confiabilidad, los resultados deben ser validados por algún método. Resulta entonces conveniente modelar computacionalmente el problema y validar los resultados experimentalmente en términos de  $\Delta T$ .

**Objetivos.** Evaluar  $\Delta T$  y SAR que se producirán en los tejidos cercanos al implante, mediante modelado computacional. Contrastar esos valores con la literatura para determinar si el implante resultará seguro. Simular escenarios intermedios que puedan ser reproducidos experimentalmente. Obtener resultados experimentales reproduciendo los escenarios intermedios. Validar todo el conjunto de simulaciones a partir de los resultados experimentales.

**Metodología.** Simulación computacional: 1) se modelaron las antenas del implante y del escáner de RF aisladas, 2) el aumento de temperatura en una cuba de agua y, 3) el aumento de temperatu-

ra en tejidos. Para esto se utilizó el método de los elementos finitos en una geometría de revolución para una formulación armónica cuasi-estática de las ecuaciones de Maxwell, acopladas con la *bio-heat equation*. Mediciones experimentales: se realizó la medición de las antenas aisladas, realizando un barrido en frecuencia y registrando el pico de resonancia. A partir de ello, se calculó la inductancia de las antenas.

*Resultados.* Las mediciones experimentales arrojaron valores de 530 [nH] y 9 [μH] para la antena del implante y del escáner respectivamente, mientras que la simulación 1) dio valores de 842 [nH] y 8.4 [μH]. La simulación 2) predijo un aumento de 0.2°C en la cuba de agua, mientras que la simulación 3) predijo SAR<sub>max</sub> = 14 mW/kg, y un ΔT<sub>max</sub> = 443x10<sup>-6</sup>°C en la parte más externa del humor vítreo.

*Discusión.* Se simuló el paciente implantado y expuesto a un CEM y también escenarios intermedios, factibles de ser validados experimentalmente. La antena del escáner modelada coincide con las mediciones experimentales, con un error del 7%. Para la antena del implante el error fue mayor debido a simplificaciones realizadas durante el modelado. Aún así, el valor es mayor al real, lo que impacta en mayores corrientes y mayor ΔT en las simulaciones que en la realidad, lo que aporta un factor de seguridad. El pequeño ΔT obtenido en 2) y 3) hace que esas experiencias no sean factibles de replicar de forma experimental debido a limitaciones en la resolución de los equipos de medición. Los máximos valores obtenidos de SAR y ΔT en 3) se encuentran alejados de los valores máximos permitidos por la literatura. La validación experimental parcial que se obtuvo a partir de la medición de antenas da un primer respaldo a los resultados obtenidos en las simulaciones 2) y 3). En el futuro se proyecta adquirir una fuente de excitación de mayor potencia para lograr un ΔT medible y poder concluir la validación experimental.

### ***Computational evaluation of temperature rise in tissues adjacent to a wireless ocular implant***

*Introduction.* Within the framework of glaucoma therapy, an active implant powered wirelessly via radiofrequency (RF) coupling is proposed. This coupling is made between an inner antenna within the implant and another one included in an external device known as RF scanner. Wireless power transfer entails patient exposure to an electromagnetic field (EMF) that may produce thermal (temperature rise ΔT) and non-thermal effects (e.g. undesired nervous system stimulation). At the operating frequency of the implant (13.56 MHz), evaluation of the interaction between the EMF and tissues must be performed in terms of specific absorption rate (SAR) and ΔT. Specifically, the following requirements must be met: SAR < 2 W/kg and ΔT < 1°C. In real practice it is difficult, if not impossible, to quantitate the SAR *in vivo*. Experimental measurements require specific tools that provide information only on phantoms. In addition, the ΔT can be quantitated *in vivo* relatively easily on the surface of the implanted subject, but not inside. On the other hand, computational simulation offers more detailed information on both above mentioned physical quantities throughout the whole geometry studied and with no need for specific laboratory tools. The disadvantage is that to provide reliable data results must be validated by some method. Therefore, computational modeling of the problem and experimental validation of results in terms of ΔT is convenient.

*Objectives.* To evaluate the ΔT and SAR that will occur in tissues close to the implant by means of computational modeling; compare these values with those reported in the literature in order to determine if the implant will be safe; simulate intermediate scenarios that can be reproduced expe-

perimentally; obtain experimental results by reproducing intermediate scenarios; validate the whole set of simulations on the basis of experimental results.

*Methodology.* Computational simulation: 1) modeling of the implant and RF scanner antennas was made separately, 2) temperature rise in a bucket of water, and 3) temperature rise in tissues. For this purpose, the method of finite elements was used in a revolution geometry for quasi-static harmonic formulation of Maxwell's equations, coupled with the bioheat equation. Experimental measurements: antennas were measured separately by means of frequency scanning with recording of the resonance peak. Based on this, inductance of antennas was calculated.

*Results.* The experimental measurements yielded values of 530 [nH] and 9 [ $\mu$ H] for the implant and scanner antennas, respectively, while simulation 1) yielded values of 842 [nH] and 8.4 [ $\mu$ H]. Simulation 2) predicted a rise of 0.2°C in the bucket, while simulation 3) predicted a SAR-max = 14 mW/kg, and a  $\Delta T_{max} = 443 \times 10^{-6}$ °C in the outermost part of the vitreous humor.

*Discussion.* The experience simulated an implanted patient exposed to an EMF as well as intermediate scenarios, feasible of experimental validation. The modeled scanner antenna is consistent with experimental measurements, with an error of 7%. For the implant antenna the error was greater due to simplifications performed during modeling. In spite of this, the value is higher than the actual one, which results in greater currents and greater  $\Delta T$  in simulations than in real life, and thereby providing a safety factor. The small  $\Delta T$  obtained in 2) and 3) makes these experiences not reproducible experimentally due to limitations in the resolution of measurement devices. The maximum values obtained for SAR and  $\Delta T$  in 3) are far from the maximum values allowed by the literature. The partial experimental validations obtained from measurements of the antennas provide a first support to the results obtained in simulations 2) and 3). Our project for the future is to acquire

a higher power excitation source to achieve a measurable  $\Delta T$  and be able to finish the experimental validation.

### ***Avaliação computacional do aumento de temperatura em tecidos adjacentes a implante ocular alimentado sem fio***

*Introdução.* No marco do tratamento do glaucoma é proposto um implante ativo alimentado sem fio através de um acoplamento de radiofrequência (RF). Esse acoplamento é produzido entre uma antena interna do implante e outra incluída em um dispositivo externo, chamado scanner de RF. A transferência de energia sem fio implica a exposição do paciente a um campo eletromagnético (CEM) que pode produzir efeitos térmicos (aumento da temperatura  $\Delta T$ ) e não térmicos (exemplo: estímulos indesejados no sistema nervoso). À frequência de trabalho do implante (13.56 MHz), o estudo da interação entre o CEM e os tecidos deve ser realizada em termos do índice de absorção específico (SAR) e  $\Delta T$ . Concretamente, é preciso cumprir: SAR < 2 W/kg e  $\Delta T$  < 1°C. Na prática resulta difícil, senão impossível, quantificar o SAR *in vivo*. As medições experimentais exigem instrumental específico que apenas contribui com informação sobre manequins. Além disso, é possível quantificar  $\Delta T$  *in vivo* com relativa facilidade na superfície do sujeito implantado, ainda que não no interior. Por outro lado, a simulação computacional fornece informação das duas quantidades físicas antes mencionadas, com maior grau de detalhe, em toda a geometria estudada e sem necessidade de instrumental de laboratório específico. Como desvantagem, para somar confiabilidade, os resultados devem ser validados por algum método. Resulta então conveniente modelar o problema computacionalmente e validar os resultados experimentalmente em termos de  $\Delta T$ .

*Objetivos.* Avaliar  $\Delta T$  e SAR que serão produzidos nos tecidos próximos ao implante, mediante modelado computacional. Contrastar esses valores com a literatura para determinar se o implan-

te resultará seguro. Simular cenários intermédios que possam ser reproduzidos experimentalmente. Obter resultados experimentais reproduzindo os cenários intermédios. Validar todo o conjunto de simulações a partir dos resultados experimentais.

**Metodologia.** Simulação computacional: 1) foram modeladas as antenas do implante e do scanner de RF isoladamente, 2) o aumento da temperatura em uma cuba de água e, 3) o aumento da temperatura em tecidos. Para isso foi utilizado o método dos elementos finitos em uma geometria de revolução para uma formulação harmônica quase estática das equações de Maxwell, acopladas com a *bioheat equation*. Medições experimentais: foi realizada a medição das antenas isoladamente, realizando um varrido de frequência e registrando pico de ressonância. A partir disso, foi calculada a indutância das antenas.

**Resultados.** As medições experimentais produziram valores de 530 [nH] e 9 [μH] para a antena do implante e do scanner respectivamente; enquanto a simulação 1) deu valores de 842 [μH] e 8.4 [μH]. A simulação 2) previu um aumento de 0.2°C na cuba de água, enquanto a simulação 3) previu SAR<sub>max</sub> = 14 mW/kg, e um ΔT<sub>max</sub> = 443x10<sup>-6</sup>°C na parte mais externa do humor vítreo.

**Discussão.** Simularam-se a situação do paciente implantado e exposto a um CEM e também cenários intermédios, factíveis de serem validados experimentalmente. A antena do scanner modelada coincide com as medições experimentais, com um erro de 7%. Para a antena do implante o erro foi maior devido a simplificações realizadas durante a modelagem. Mesmo assim, o valor é maior do que o valor real, o que impacta em maiores correntes e maior ΔT nas simulações que na realidade, e isso contribui como um fator de segurança. O pequeno ΔT obtido em 2) e 3) faz com que essas experiências não sejam factíveis de replicar de forma experimental devido às limitações na resolução dos equipamentos de medição. Os máximos valores obtidos de SAR e ΔT em 3) estão longe

dos valores máximos permitidos pela literatura. A validação experimental parcial obtida a partir da medição de antenas dá um primeiro respaldo aos resultados obtidos nas simulações 2) e 3). No futuro se projeta adquirir uma fonte de excitação de maior potência para obter um ΔT mensurável e poder concluir a validação experimental.

## Los polímeros tipo elastina y su aplicación en la liberación de fármacos

Fernández-Colino A<sup>a\*</sup>, Quinteros D<sup>bδ</sup>, Bermúdez J<sup>cψ</sup>, Arias FJ<sup>a\*</sup>, Allemandi DA<sup>b</sup>, De Palma S<sup>bδ</sup>, Rodríguez-Cabello JC<sup>a\*</sup>.

<sup>a</sup> GIR Bioforge, Universidad de Valladolid, CIBER-BBN, Valladolid, España.

<sup>b</sup> Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

<sup>c</sup> Instituto de Investigaciones para la Industria Química (INI-QUI-CONICET), Universidad Nacional de Salta (UNSa), Salta, Argentina.

Contacto: afernandez@bioforge.uva.es

**Introducción.** Los materiales biológicos gozan de unas propiedades extraordinarias que son fruto de miles de años de evolución durante los cuales la selección natural ha permitido que sólo los mejores diseños perduren. De ahí que resulte muy interesante crear materiales artificiales que mimeticen a los naturales. Además, el propósito de la ciencia de materiales no es tan sólo copiar los diseños naturales, sino mejorarlos, creando compuestos bio-inspirados con propiedades más avanzadas que no están presentes en la naturaleza. Un ejemplo muy significativo de esta relación entre material biológico y material bio-inspirado lo constituyen la elastina y los polímeros tipo elastina, respectivamente.

**Objetivos.** El diseño y la obtención de polímeros tipo elastina de carácter recombinante, denominados como *elastin like recombinamers* (ELR) o recombinámeros tipo elastina, diseñados específicamente

camente para su aplicación en el área de la biomedicina y concretamente en la liberación controlada de fármacos oftalmológicos.

*Metodología.* Para la construcción de los ELR se emplearon las técnicas estándar de biología molecular, que nos permiten obtener productos proteicos con un control absoluto de la secuencia aminoácida. La purificación de dichos materiales se realizó mediante ciclos de transición inversa con la temperatura. Los productos finales se caracterizaron por calorimetría diferencial de barrido, análisis de aminoácidos, maldi-tof y RMN. La capacidad de termo-gelificación fue testada por reología y la liberación *in vitro* se realizó en celdas de Franz utilizando el fármaco acetazolamida.

*Resultados y discusión.* La similitud a nivel de secuencia entre la elastina y los ELR producidos se tradujo en una similitud en otra serie de propiedades, como las mecánicas, la biocompatibilidad, la naturaleza termosensible y el comportamiento autoensamblable. Estas dos últimas características capacitan al polímero para su organización en hidrogeles físicos, con potenciales aplicaciones en biología y medicina. Entre tales aplicaciones se encuentran la liberación controlada de fármacos. Concretamente, se han realizado estudios *in vitro* de la liberación controlada del fármaco acetazolamida, observándose una liberación sostenida.

*Conclusiones.* La capacidad de los ELR desarrollados en auto-ensamblaje en respuesta a los cambios ambientales como el pH, la temperatura o el contenido de sal se los hace muy atractivos para la construcción de nano-dispositivos para su utilización en la liberación controlada de fármacos así como en otras aplicaciones nano-biotecnológicas avanzadas.

### ***Elastin-like polymers and their application in drug release***

*Introduction.* Biologic materials have extraordinary properties as a result of thousands of years of evolution over which natural selection has enabled only those having the best designs to persist. The-

refore, creation of artificial materials mimicking natural ones is very interesting. In addition, the purpose of the science of materials does not only lie in reproducing natural designs but rather in improving them, thus creating bioinspired compounds with more advanced properties not present in nature. A highly significant example of this relationship between biologic material and bioinspired material is elastin and elastin-like polymers, respectively.

*Objectives.* Design and obtainment of elastin-like polymers of recombinant character, known as elastin-like recombinants (ELR) or elastin-like recombinamers, for their specific application in the area of biomedicine and particularly in controlled release of ophthalmic drugs.

*Methodology.* For the construction of ELR, standard techniques of molecular biology allowing for creation of protein products with absolute control of the aminoacid sequence, were used. Purification of these materials was performed by means of inverse (temperature) transition cycling. The end products were characterized by differential scanning calorimetry, aminoacid analysis, maldi-tof and MRI. Thermal gelation ability was tested by rheology and *in vitro* release was performed in Franz diffusion cells using acetazolamide.

*Results and discussion.* The similarity between elastin and ELR at the sequence level translated into a similarity in another series of properties, such as mechanic properties, biocompatibility, thermosensitive nature and self-assembling behavior. This two latter features provide the polymer with the ability to organize itself into physical hydrogels with potential applications in biology and medicine. Among these applications we can find controlled drug release. *In vitro* studies on controlled drug release have been conducted specifically with acetazolamide, with sustained release observed.

*Conclusions.* The ability of the ELR developed in self-assembly in response to environmental changes such as pH, temperature or salt content, makes them very attractive for the creation of na-

nodevices to be used in controlled drug release as well as for other advanced nano-biotechnological applications.

### ***Os polímeros tipo elastina e sua aplicação na liberação de fármacos***

*Introdução.* Os materiais biológicos possuem propriedades extraordinárias que são fruto de milhares de anos de evolução durante os quais a seleção natural tem permitido que apenas os melhores desenhos perdurassem. Daí que seja muito interessante criar materiais artificiais que mimetizem os naturais. Além disso, o propósito da ciência de materiais não é tão só copiar os desenhos naturais, mas melhorá-los, criando compostos bioinspirados com propriedades mais avançadas, que não estão presentes na natureza. Um exemplo muito significativo desta relação entre material biológico e material bioinspirado é a elastina e os polímeros tipo elastina, respectivamente.

*Objetivos.* O desenho e a obtenção de polímeros tipo elastina de caráter recombinante, denominados como *elastin like recombinamers* (ELR) ou recombinantes de *tipo elastina*, desenhados especificamente para sua aplicação na área da biomedicina e concretamente na liberação controlada de fármacos oftalmológicos.

*Metodologia.* Para a construção dos ELR foram empregadas as técnicas padrão de biologia molecular, que permitem obter produtos proteicos com um controle absoluto da sequência aminoácida. A purificação desses materiais foi realizada mediante ciclos de transição inversa com a temperatura. Os produtos finais se caracterizaram por calorimetria diferencial de varrimento, análise de aminoácidos, maldi-tof e RMN. A capacidade de termogelificação foi testada por reologia e a liberação *in vitro* foi realizada em células de Franz utilizando o fármaco acetazolamida.

*Resultados e discussão.* A semelhança no nível de sequência entre a elastina e os ELR produzidos foi refletida em uma semelhança em outra série de propriedades, como as mecânicas, a biocompati-

bilidade, a natureza termo sensível e o comportamento autoensamblável. Estas duas últimas características capacitam o polímero para sua organização em hidrogéis físicos, com potenciais aplicações em biologia e medicina. Entre tais aplicações está a liberação controlada de fármacos. Concretamente, realizaram-se estudos *in vitro* da liberação controlada do fármaco acetazolamida e se observou uma liberação sustentada.

*Conclusões.* A capacidade dos ELR desenvolvidos em autoensamblagem em resposta as mudanças ambientais como o pH, a temperatura ou o conteúdo de sal, faz com que sejam muito atraentes para a construção de nano-dispositivos para utilização na liberação controlada de fármacos, assim como em outras aplicações nano-biotecnológicas avançadas.

### **El factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF-1) regula la actividad de MMP-2 en células gliales de Müller vía PI3K/Akt**

Lorenc V, Sánchez MC.

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

Contacto: vlorenc@fcq.unc.edu.ar

*Introducción.* Retinopatías como la diabética proliferativa (RDP) y la del prematuro (ROP) son el resultado de una neovascularización patológica. Uno de los factores involucrados es el IGF-1. Resultados previos demuestran que células MIO-M1 expresan el receptor de este factor (IGF-1R) y que bajo estímulo con IGF-1 son capaces de migrar a través de un mecanismo que involucra la actividad de la metaloproteínasa MMP-2.

*Materiales y métodos.* En este trabajo investigamos los mecanismos moleculares que regulan estos eventos de migración y su relación con MMP-2. Para ello, las células se estimularon con IGF-1 10 nM por 4, 6 y 8 horas previa incubación con inhi-

bidores farmacológicos de las vías de señalamiento MAPK-ERK1/2 o PI3K/Akt o con un anticuerpo que bloquea la unión ligando-receptor ( $\alpha$ IR3) y tanto los sobrenadantes como los lisados celulares fueron analizados por ensayos de zimografía y Western *blot*, respectivamente. Además, la migración celular fue evaluada a las 24 horas.

**Resultados.** Los resultados indican que la inhibición de la vía PI3K/Akt con LY294002 restableció la actividad de MMP-2 en los sobrenadantes celulares. También la preincubación con  $\alpha$ IR3 fue capaz de inhibir no sólo la activación de las vías de señalamiento sino la migración celular.

**Conclusión.** Estos resultados indican que el sistema IGF-1/IGF-1R tiene la capacidad de regular la migración celular y la activación de MMP-2 via PI3K/Akt.

### ***Insulin like growth factor 1 (IGF-1) regulates MMP-2 activity in Müller glial cells via PI3K/Akt***

**Introduction.** Retinopathies, such as proliferative diabetic retinopathy (PDR) and retinopathy of prematurity (ROP) occur as a result of pathologic neovascularization. One of the factors involved is IGF-1. Previous results demonstrate that MIO-M1 cells express the receptor of this factor (IGF-1R) and that under stimulation with IGF-1 they are capable of migrating through a mechanism involving matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) activity.

**Materials and methods.** In this paper we have investigated the molecular mechanisms regulating these migration events and their relationship with MMP-2. For such purpose, cells were stimulated with IGF-1 10 nM for 4, 6 and 8 hours after incubation with MAPK-ERK1/2 or PI3K/Akt signaling pathway inhibitors or with an antibody blocking ligand-receptor binding ( $\alpha$ IR3), and both supernatants and cell lysates were analyzed by zymographic assays and Western blot, respectively. In addition, cell migration was evaluated after 24 hours.

**Results.** Results indicate that PI3K/Akt pathway inhibition with LY294002 restored MMP-2 activity on cell supernatants. In addition, preincubation with  $\alpha$ IR3 could inhibit not only activation of signaling pathways but also cell migration.

**Conclusion.** These results indicate that the IGF-1/IGF-1R system has the ability of regulating cell migration and MMP-2 activation via PI3K/Akt.

### ***O fator de crescimento insulínico tipo I (IGF-1) regula a atividade de MMP-2 em células gliais de Müller via PI3K/Akt***

**Introdução.** Retinopatias como a diabética proliferativa (RDP) e da prematuridade (ROP) são o resultado de uma neovascularização patológica. Um dos fatores envolvidos é o IGF-1. Resultados prévios demonstram que células MIO-M1 expressam o receptor desse fator (IGF-1R) e que sob o estímulo com IGF-1 são capazes de migrar através de um mecanismo que envolve a atividade da metaloproteinase MMP-2.

**Materiais e métodos.** No presente trabalho pesquisamos os mecanismos moleculares que regulam esses eventos de migração e sua relação com MMP-2. Para isso, as células foram estimuladas com IGF-1 10 nM por 4, 6 e 8 horas prévia incubação com inibidores farmacológicos das vias de sinalização MAPK-ERK1/2 ou PI3K/Akt ou com um anticorpo que bloqueia a ligação ligando-receptor ( $\alpha$ IR3) e tanto os sobrenadantes como os lisados celulares foram analisados por ensaios de zimografia e Western *blot*, respectivamente. Além disso, a migração celular foi avaliada após 24 horas.

**Resultados.** Os resultados indicam que a inibição da via PI3K/Akt com LY294002 reestabeleceu a atividade de MMP-2 nos sobrenadantes celulares. Também a pré-incubação com  $\alpha$ IR3 foi capaz de inibir não apenas a ativação das vias de sinalização, mas também a migração celular.

**Conclusão.** Estes resultados indicam que o sistema IGF-1/IGF-1R tem a capacidade de regular a migração celular e a ativação de MMP-2 via PI3K/Akt.



## Reversión de fotoisomerización de todo-trans-retinal en cultivos primarios de células ganglionares de la retina de pollo

Díaz N<sup>a</sup>, Morera L<sup>a</sup>, Tempesti T<sup>b</sup>, Baumgartner MT<sup>b</sup>, Guido M<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Centro de Investigaciones en Química Biológica de Córdoba (CIQUIBIC)-CONICET, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

<sup>b</sup> Instituto de Investigaciones en Físicoquímica de Córdoba (INFIQC)-CONICET, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba.

Contacto: ndiaz@fcq.unc.edu.ar

En estudios anteriores hemos demostrado la presencia de células ganglionares intrínsecamente fotosensibles (ipRGCs) que expresan el fotopigmento melanopsina (OPN4) en retina de pollo. Además, hemos encontrado que la retina interna de pollo tiene la capacidad de síntesis de 11 - cis retinal de una manera dependiente de la luz. En el presente estudio se determinó la capacidad de los cultivos primarios de células ganglionares de la retina (RGC) a partir de todo-trans retinal del medio y para isomerizarlos por medio de luz. Los cultivos de RGC se obtuvieron por *immunopanning* de retina embrionaria de pollo de 8 días con un anticuerpo OPN4X para aumentar la cantidad de ipRGCs. Después de esto, las células se irradiaron con luz blanca o se mantuvieron en la oscuridad. Los retinoides se extrajeron y se analizaron por HPLC. Los cultivos primarios obtenidos expresan diferentes marcadores neuronales con una morfología típica RGC mostrar procesos largos después de 4 días. Otros tipos de células de la retina no se detectaron de manera significativa en los cultivos. Las células se alimentaron con todo-trans retinal 3 horas y se expone a un pulso de luz de 1 h, se encontraron niveles detectables de 11 -cis retinal

en los cultivos por HPLC. Como habíamos informado anteriormente en la retina interna pollo, los cultivos de RGC exhiben la capacidad de isomerización 11 - cis retinal a partir de todo-trans retinal bajo la estimulación de luz. Esto sugiere fuertemente la presencia de una actividad fotoisomerasa en estas células.

### *Reversal photoisomerization of all-trans retinal in primary cultures of chicken retinal ganglion cells*

In previous studies we have demonstrated the presence of intrinsically photosensitive retinal ganglion cells (ipRGCs) that express the photopigment melanopsin (OPN4) in chicken retinas. In addition, we have found that the inner retina of chicken has the ability of synthesizing 11-cis retinal in a light-dependent fashion. This study determined the ability of primary cultures of retinal ganglion cells (RGCs) to take up all-trans retinal from the medium and to isomerize it by means of light. RGC cultures were obtained by immunopanning of the retinas of embryo chickens of 8 days with an OPN4X antibody to increase the number of ipRGCs. After this, cells were irradiated with white light or maintained in the dark. Retinoids were extracted and analyzed with HPLC. The primary cultures obtained express different neuronal markers with the typical morphology of RGCs and exhibit long processes after 4 days. Other types of retinal cells failed to be detected significantly in cultures. After cells were fed all-trans retinal for 3 hours and exposed to a 1h-light pulse, detectable levels of 11-cis retinal were found in cultures by HPLC. As previously reported, in the inner chicken retina, RGC cultures exhibit the ability to isomerize 11-cis retinal from all-trans retinal under light stimulation. This strongly suggests the presence of photoisomerase activity in these cells.

### ***Reversão de fotoisomerização de todo-trans retinal em culturas primárias de células ganglionares da retina de frango***

Em estudos anteriores temos demonstrado a presença de células ganglionares intrinsecamente fotossensíveis (ipRGCs) que expressam o fotopigmento melanopsina (OPN4) em retina de frango. Além disso, temos encontrado que a retina interna de frango tem a capacidade de síntese de 11 -cis retinal de uma forma dependente da luz. No presente estudo se determinou a capacidade das culturas primárias de células ganglionares da retina (RGC) a partir de todo-trans retinal do meio, para isomerizá-las mediante a luz. As culturas de RGC foram obtidas por *immunopanning* de retina embrionária de frango de oito dias com um anticorpo OPN4X para aumentar

a quantidade de ipRGCs. Depois disso, as células foram irradiadas com luz branca ou mantidas na escuridão. Os retinoides foram extraídos e analisados por HPLC. As culturas primárias obtidas expressam diferentes marcadores neuronais com uma morfologia típica RG para mostrar processos longos após quatro dias. Outros tipos de células da retina não foram detectados de maneira significativa nas culturas. As células foram alimentadas com todo-trans retinal durante três horas e expostas a um pulso de luz de 1 h, foram encontrados níveis detectáveis de 11 -cis retinal nas culturas por HPLC. Como informado antes, na retina interna do frango, as culturas de RGC exibem a capacidade de isomerização 11 -cis retinal a partir de todo-trans retinal sob a estimulação de luz. Isso sugere a presença de uma atividade *photoisomerase* nessas células.