

Publicación científica del Consejo Argentino de Oftalmología • ISSN 1851-2658 • Volumen 7 • Número 4 • Diciembre 2014

OFTALMOLOGÍA


Clínica y Experimental

v 7.4



PFÖRTNER
CONTACTOLOGIA - ÓPTICA - PRÓTESIS

M O D A A U D A Z Y E L E G A N T E

Imagen al sólo efecto ilustrativo, no vinculante. Todos los derechos reservados. La imagen y el antepecho son una gentileza de  SWAROVSKI

Casa Central: Av. Pueyrredón 1706 - C1119ACN Bs. As. - Tel.: (54-11) 4827-8600 - Fax: (54-11) 4827-8615
info@pfortner.com - www.pfortner.com y Centros de Atención Cornealent. Consulte a su oftalmólogo.

IX Congreso nacional de la Asociación de Investigación en Visión y Oftalmología (AIVO) (parte I)	109
9th National meeting of the Asociación de Investigación en Visión y Oftalmología (AIVO) (Association for Research in Vision and Ophthalmology) (part I)	110
IX Congresso nacional da Associação de Investigação em Visão y Oftalmologia (AIVO) (Associação para Pesquisa em Visão e Oftalmologia) (parte I)	111
Conferencias AIVO / AIVO Lectures / Palestras AIVO	112
Investigaciones presentadas / Research papers presented / Pesquisas apresentadas	113
INSTRUCCIONES PARA LOS AUTORES	19
INSTRUCTIONS FOR AUTHORS	20
INSTRUÇÕES PARA OS AUTORES	21

5.4

Sumario

Publicación científica
del Consejo Argentino
de Oftalmología

Volumen 5
Número 4
Diciembre de 2012

OFTALMOLOGÍA

Clínica y Experimental

La publicación *Oftalmología Clínica y Experimental* tiene una frecuencia trimestral (cuatro números por año). El objetivo es brindar acceso a material científico en español, en portugués y en inglés. Contiene trabajos originales de investigación clínico-quirúrgica y básica, comunicaciones breves, informe de casos y series, revisiones sistemáticas, apuntes en medicina basada en la evidencia, bioestadística y prevención de la ceguera, comentarios de resúmenes destacados para la práctica oftalmológica presentados en congresos y reuniones de la especialidad y referencias a publicaciones de otras revistas. Se estimula el envío de correspondencia para la sección de cartas de lectores abierta a todos los profesionales que deseen expresar sus comentarios sobre los trabajos publicados y observaciones preliminares importantes para la práctica oftalmológica. Los trabajos recibidos son evaluados por profesionales con conocimiento del tema tratado de acuerdo con normas internacionales. La revista contará con un sistema de autoevaluación para contabilizar créditos de educación permanente. Los artículos podrán ser localizados e identificados a través de los buscadores usuales de la web abierta y bases de datos regionales.

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

Editor en jefe

Javier Casiraghi

Editores en jefe asociados

Alejandra Carrasco Ariel Schlaen

Editores por sociedades

SARYV

Miriam Frós

AIVO

Juan E. Gallo

ASAG

Jorge Federico Lynch

CAE

Fernando Prieto Díaz

SAPO

Carlos Mir

Consejo editorial

Alejandro Berra
Leonardo D'Alessandro
Rodrigo M. Torres

Van C. Lausingsh
Pablo Larrea
David Pelayes

Julio Urrets Zavalía
Ricardo Wainstein
Felisa Sheldón

Emiliano Becerra
Ruth Rosenstein

Cristóbal Couto
Daniel Weil

Consejo asesor

Myriam Berman
Rosque Maffrand
Alberto Naveyra

Pablo Charadía
Enrique S. Malbran
Javier Odoriz Pola

Alberto Cianciá
Arturo Maldonado Bar
Roberto Sampaolosi

Ricardo Dodds
Jame Yankelevich

Hugo Dionisio Nano
Alejo Vercesi

Equipo editorial

Raúl Escandar

Jorge Martín

Myriam Tencha

Inés Ramírez Bosco

Domicilio editorial: Las instrucciones para los autores se encuentran al final de la publicación. Correspondencia al editor: secretaria@oftalmologos.org.ar. Consejo Argentino de Oftalmología, Tte. Gral. J. D. Perón 1479, PB, 1037AAO, Buenos Aires, Argentina - Teléfonos: (54-11) 4374-5400 líneas rotativas.

Consejo Argentino de Oftalmología • Comité ejecutivo 2012-2013



Presidente:

Dr. Ernesto Ferrer

Vicepresidentes:

Dr. Pablo Dupont

Secretario:

Dr. Gustavo Bodino

Secretario adjunto:

Dr. Fernando Guafarú Lemos

Tesorero:

Javier Casiraghi

Protesorero:

Dr. Carlos A. Rodríguez

Director ejecutivo:

Dr. Roberto Ebner

Director de Docencia

e Investigación:

Dr. Julio Manzini

IX Congreso nacional de la Asociación de Investigación en Visión y Oftalmología (AIVO)(parte 1)

El 23 y 24 de noviembre de 2012 se realizó en la ciudad de Buenos Aires el VII Congreso Nacional de la Asociación de Investigación en Visión y Oftalmología (AIVO), capítulo argentino de la Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), Estados Unidos. El comité organizador estuvo constituido por el Dr. Juan Galló, presidente de AIVO, y los doctores Pablo Franco, Juan Oscar Croxatto, Ruth Rosenstein, Angélica Suburo, Emiliano S. López y Pablo Sande.

Esta importante reunión tuvo la destacada participación de dos invitados extranjeros: la Dra. Valeria Carró-Soler, quien se desempeña en el Wilmer Eye Institute, de Baltimore (Estados Unidos) y el Dr. Paulo Stranga, quien trabaja en el Manchester Royal Eye Hospital, Reino Unido, quienes participaron con las ponencias principales en las denominadas Conferencias AIVO. Por otra parte, cabe destacar que la Legislatura de la Ciudad de Buenos Aires distinguió a ambos investigadores declarándolos personalidades destacadas de la ciudad y haciéndoles entrega de sendas distinciones el 23 de noviembre de 2012 en el Salón Eva Perón de la Legislatura porteña.

Valeria Carró-Soler estudió en la Universidad Nacional de Córdoba, fue becaria del CONICET y recibió su doctorado en Ciencias Biomédicas en la Universidad Austral en 2002. Después de un período de entrenamiento posdoctoral en el Wilmer Eye Institute, fue incorporada al cuerpo académico de la Johns Hopkins Medical School en 2006.

Paulo Stranga es oftalmólogo egresado de la Universidad de Buenos Aires y actualmente se desempeña como profesor asociado de Oftalmología y oftalmólogo consultor en el Manchester Royal Eye Hospital (Gran Bretaña). Su interés se centra en la cirugía vitroretinal y en la regeneración de la visión.

El programa del Congreso AIVO incluyó la presentación de 40 trabajos de investigación básica y clínica. Todas las presentaciones se realizaron en sesiones únicas con inclusión de todos los asistentes y con una valiosa y enriquecedora participación interactiva por parte de los investigadores básicos y los oftalmólogos asistentes.

Cabe destacar la participación de jóvenes graduados de distintas áreas del conocimiento (biología, física, química, farmacología, psicología y medicina) quienes dan testimonio del crecimiento de las investigaciones relacionadas con la visión.

A continuación se transcriben los resúmenes del congreso, gracias a la generosa autorización del presidente de la AIVO, el Dr. Juan Galló. Dichos resúmenes se traducen al inglés y al portugués, los otros dos idiomas aceptados por nuestra revista.

9th National meeting of the Asociación de Investigación en Visión y Oftalmología (AIVO) [Association for Research in Vision and Ophthalmology] (part I)

The 9th National Meeting of the AIVO, the Argentinian chapter of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), U.S.A., was held in the city of Buenos Aires on November 23 and 24, 2012. The organizing committee was made up of Dr. Juan Gallo, AIVO President; and Drs. Pablo Franco, Juan Oscar Croxatto, Ruth Rosenstein, Angela Suburo, Emiliano S. López and Pablo Sande.

This important meeting had the participation of two keynote foreign guest speakers: Dr. Valeria Cantó-Soler, who has a position at the Wilmer Eye Institute of Baltimore (U.S.A.) and Dr. Paulo Stanga, who works at the Manchester Royal Eye Hospital, Great Britain. Both of them were in charge of the main lectures within the framework of what has been called AIVO Lectures. It should be stressed that both researchers were declared outstanding personalities of the city by the City Council of Buenos Aires and they were conferred distinctions on November 23, 2012 at the Eva Perón Room of the City Council of Buenos Aires.

Valeria Cantó-Soler obtained her degree at the National University of Córdoba, she served a fellowship program at the CONICET and obtained her doctorate degree in Biomedical Sciences from Universidad Austral in 2002. After her postdoctoral training at the Wilmer Eye Institute, she joined the academic staff of the Johns Hopkins Medical School in 2006.

Paulo Stanga obtained his degree as ophthalmologist at the University of Buenos Aires and currently holds the position of Associate Professor in Ophthalmology and Consultant Ophthalmologist at the Manchester Royal Eye Hospital (Great Britain). His main interest focuses on vitreoretinal surgery and vision restoration.

The AIVO Meeting program included the presentation of 40 basic and clinical research papers. All presentations were made in single sessions with the inclusion of all attendants and with a valuable and fruitful interactive participation of basic researchers and ophthalmologists who attended the meeting.

The participation of graduated young attendants from different fields of knowledge (biology, physics, chemistry, pharmacology, psychology and medicine), who can give testimony of the growth of research related to vision, should be stressed.

Here we will reproduce the abstracts of the presentations made during the meeting, thanks to the generous authorization of the President of the AIVO, Juan Gallo. These abstracts have been translated into English and Portuguese, the other two languages accepted by our journal.

IX Congreso nacional da Asociación de Investigación en Visión y Oftalmología (AIVO) [Associação para Pesquisa em Visão e Oftalmologia] (parte 1)

Os dias 23 e 24 de novembro de 2012 teve lugar na cidade de Buenos Aires o IX Congresso nacional da AIVO, apartado argentino da Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), Estados Unidos. O comité organizador esteve constituído pelo Dr. Juan Gallo, presidente da AIVO e os doutores Pablo Franco, Juan Oscar Croxatto, Ruth Rosenstein, Angela Suburo, Emiliano S. López e Pablo Sande.

Esta importante reunião teve a destacada participação de dois convidados estrangeiros: a Dra. Valeria Cantó-Soler, quem se desempenha no Wilmer Eye Institute, de Baltimore (Estados Unidos) e o Dr. Paulo Stanga, quem trabalha no Manchester Royal Eye Hospital, Reino Unido. Eles foram os encarregados das principais palestras nas denominadas Palestras AIVO. Além disso, convém destacar que a Legislatura da Cidade de Buenos Aires distinguiu ambos os pesquisadores: no dia 23 de novembro de 2012 no salão Eva Perón da Legislatura portenha foram declarados personalidades destacadas da cidade e entregaram-lhes várias distinções.

Valeria Cantó-Soler estudou na Universidade Nacional de Córdoba, foi bolsista do CONICET e recebeu seu doutorado em Ciências Biomédicas na Universidade Austral no ano 2002. Depois de um período de treinamento de pós-doutoramento no Wilmer Eye Institute, foi incorporada ao corpo acadêmico da Johns Hopkins Medical School em 2006.

Paulo Stanga é oftalmologista formado na Universidade de Buenos Aires e atualmente se desempenha como professor associado de Oftalmologia e como oftalmologista consultor no Manchester Royal Eye Hospital (Grã Bretanha). Seu interesse está centrado na cirurgia vitreoretiniana e na regeneração da visão.

O programa do Congresso AIVO inclui a apresentação de 40 trabalhos de pesquisa básica e clínica. Todas as apresentações foram realizadas em sessões únicas com inclusão de todos os assistentes e com uma valiosa e enriquecedora participação interativa por parte dos pesquisadores básicos e os oftalmologistas assistentes.

Convém destacar a participação de jovens graduados de distintas áreas do conhecimento (biologia, física, química, farmacologia, psicologia e medicina) quem dão testemunho do crescimento das pesquisas relacionadas com a visão.

A seguir se transcrevem os resumos do congresso, graças à generosa autorização do presidente da AIVO, o Dr. Juan Gallo. Esses resumos estão traduzidos ao Inglês e ao português, as outras duas línguas aceitas por nossa publicação.

CONFERENCIAS AIVO / AIVO LECTURES / PALESTRAS AIVO

Generación de retinas tridimensionales *in vitro* a partir de células madre humanas pluripotentes inducidas

Dra. Valeria Cantá-Soler

Wilmer Eye Institute, School of Medicine, Johns Hopkins University, Baltimore, Estados Unidos.

La invitada especial presenta un sistema *in vitro* recientemente establecido en su laboratorio, capaz de dirigir a las células madre humanas pluripotentes inducidas (hiPSC) a recapitular los principales eventos de diferenciación celular que ocurren durante el desarrollo del ojo *in vivo*, incluyendo la formación de una retina estratificada.

***In vitro* generation of tridimensional retinas from human induced pluripotent stem cells**

The special guest speaker presents an *in vitro* system recently implemented in her laboratory that is capable of directing human induced pluripotent stem cells (hiPSC) to recapitulate the main events of cell differentiation occurring during the development of the eye *in vivo*, including the formation of a stratified retina.

Geração de retinas tridimensionais in vitro a partir de células-tronco humanas pluripotentes induzidas

A convidada especial apresenta um sistema *in vitro* recentemente estabelecido em seu laboratório, capaz de levar as células-tronco humanas pluripotentes induzidas (hiPSC) a sintetizar os principais eventos de diferenciação celular que ocorrem durante o desenvolvimento do olho *in vivo*, incluindo a formação de uma retina estratificada.

Prótesis retinal electrónica para visión artificial: actualización de la tecnología disponible y experiencia personal

Dr. Paulo Stanga

Manchester Royal Eye Hospital, Manchester Central y Manchester Children's University Hospitals, Great Britain.

Con la ayuda de avances tecnológicos se han desarrollado nuevas prótesis que permiten un cierto grado de visión en pacientes ciegos. Se han implementado prótesis esclerales o epirretinales cuyos resultados —muy promisorios— se publicaron recientemente en revistas internacionales. Nuevas posibilidades, impensables hace pocos años, surgen actualmente para el tratamiento de la ceguera.

Electronic retinal prosthesis for artificial vision: update on available technology and personal experience

With the aid of technological breakthrough, new prostheses offering blind patients a limited degree of vision have been developed. Scleral or epiretinal prostheses have been implemented, the —very promising— results of which have been published recently in international journals.

New possibilities that were unthinkable a few years ago, are currently emerging for the treatment of blindness.

Prótese retiniana eletrônica para visão artificial: atualização da tecnologia disponível e experiência pessoal.

Com a ajuda dos avanços tecnológicos foram desenvolvidas novas próteses que permitem um determinado grau de visão nos pacientes cegos. Implementaram-se próteses esclerais ou epirretinianas cujos resultados —muito promissórios— foram publicados recentemente em revistas internacionais. Novas possibilidades, impensáveis alguns anos atrás, surgem na atualidade para o tratamento da cegueira.

INVESTIGACIONES PRESENTADAS / RESEARCH PAPERS PRESENTED / PESQUISAS APRESENTADAS

Modelo experimental de queratitis inducida por láser de argón en cobayos

Morán R, Suárez MP, Benatti A, Espósito E, Correa L, Crián N, Urrets Zavala JA, Serra HM*

*Centro de la Visión, Clínica Universitaria Reina Fabiola, Universidad Católica de Córdoba.

†CIBICI-CONICET, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba.

‡Clínica de Ojos de Córdoba.

fuoromunsh@hotmail.com; ml.suarez10@gmail.com

Objetivo. Provocar lesiones reproducibles en epitelio y estroma superficial de córnea de cobayos utilizando láser de argón y evaluar el proceso de recuperación mediante biomicroscopía (BM) y tomografía de coherencia óptica (OCT).

Métodos. Se utilizaron cobayos pigmentados siguiendo las normas para cuidado de animales de ARVO. Errores: se empleó láser de argón de uso oftalmológico (Novus 2000, Coherent), utilizado con su montaje en lámpara de hendidura. Algunos ojos no fueron tratados (control, n=2) y otros recibieron 7 disparos focalizados sobre el epitelio corneal central con diferentes potencias (500, 400, 350, 300, 150 y 100 mW) con un tiempo de exposición y tamaño de disparo constantes (n=2) para cada condición. Se controlaron las alteraciones corneales inducidas mediante BM (Haag Streit 900) y OCT (Visante y Cirrus, Carl Zeiss) a los siguientes tiempos: 1 hora, 14 horas, 7 días, 14 días y 21 días.

Resultados. En los controles efectuados por BM se observó la presencia de leucomas cuya persistencia en el tiempo se correlacionó con la potencia de láser empleada. Con 500, 400 y 350 mW los leucomas se registraron hasta el día 21 de control. Con 300 y 150 mW los leucomas desaparecieron hacia el día 7, y con 100 mW a las 14 horas ya no se observaron leucomas. Mediante OCT se observó un adelgazamiento del espesor corneal en los animales tratados con respecto del control [35% a 500 mW, 36% a 400 mW, 6% a 350 mW (7 disparos), 11% a 300 mW (15 disparos), 17% a 300 mW, 4% a 150 mW y 7% a 100 mW]. Una completa

recuperación del espesor corneal se observó a los 7 días.

Conclusiones. Fue posible desarrollar lesiones corneales de epitelio y estroma anterior de manera reproducible. El espesor corneal se redujo de manera proporcional a la intensidad del láser y los leucomas se observaron fundamentalmente cuando se utilizaron altas intensidades. Las córneas se recuperaron en todos los casos en una semana.

Subsidios. SECYT UNC, CONICET PIP, FONCYT PICT.

An experimental model of argon-laser induced keratitis in guinea pigs

Objective. To generate reproducible lesions in the corneal epithelium and superficial stroma of guinea pigs using argon laser and evaluate the recovery process by means of biomicroscopy (BM) and Optical Coherence Tomography (OCT).

Methods. Pigmented guinea pigs were used according to ARVO guidelines for animal research. Errores: an argon laser device (Novus 2000, Coherent) for ophthalmic practices, mounted on a slit lamp, was used. Some eyes were left untreated (control, n= 2) and others received 7 shots directed at the central corneal epithelium at different powers (500, 400, 350, 300, 150 and 100 mW) and with constant exposure time and shot size (n = 2) for each condition. Induced corneal alterations induced were controlled by BM (Haag Streit 900) and OCT (Visante & Cirrus, Carl Zeiss) at the following time-points: 1 hour, 14 hours, 7 days, 14 days and 21 days.

Results. Controls by BM revealed the presence of leukomas, the time persistence of which had a correlation with the laser power used. At 500, 400 and 350 mW, leukomas had disappeared by day 7, and at a power of 100 mW of power, there were no leukomas at 14 hours. OCT revealed corneal thickness thinning in animals treated vs. controls [35% at 500 mW, 36% at 400 mW, 6% at 350 mW (7 shots), 11% at 300 mW (15 shots), 17% at 300 mW, 4% at 150 mW and 7% at 100 mW]. Full recovery of corneal thickness was observed on day 7.

Conclusions. We were able to develop reproducible corneal lesions of the anterior epithelium and stroma.

The corneal thickness reduction was proportional to the laser intensity and leukomas were observed mainly at high power. All corneas had recovered in all cases within one week.

Supports: SECYT UNC, CONICET PIP; FON-CYT PICT

Modelo experimental de ceratite induzida por laser argon em cobaias

Objetivo. Provocar lesões reprodutíveis no epitélio e estroma superficial da córnea de cobaias utilizando laser de argônio e avaliar o processo de recuperação mediante biomicroscopia (BM) e tomografia de coerência óptica (OCT).

Métodos. Foram utilizadas cobaias pigmentadas seguindo as normas para cuidado de animais da ARVO. Erosões: foi usado laser de argônio para uso oftálmico (Novus 2000, Coherent), utilizado com sua montagem em lâmpada de fenda. Alguns olhos não foram tratados (controle, n=2) e outros receberam sete disparos focalizados sobre o epitélio corneano central com diferentes potências (500, 400, 350, 300, 150 e 100 mW) com um tempo de exposição e tamanho de disparo constantes (n=2) para cada condição. Foram controladas as alterações corneanas induzidas mediante BM (Haag Streit 900) e OCT (Visante e Cirrus, Carl Zeiss) nos seguintes tempos: 1 hora, 14 horas, sete dias, 14 dias e 21 dias.

Resultados. Nos controles realizados por BM observou-se a presença de leucomas cuja persistência no tempo foi correlacionada com a potência de laser empregada. Com 500, 400 e 350 mW os leucomas foram registrados até o dia 21 de controle. Com 300 e 150 mW, os leucomas desapareceram por volta do dia 7, e com 100 mW às 14 horas já não foram observados leucomas. Mediante OCT foi possível ver um afinamento da espessura corneana nos animais tratados à respeito do controle [35% a 500 mW, 36% a 400 mW, 6% a 350 mW (7 disparos), 11% a 350 mW (15 disparos), 17% a 300 mW, 4% a 150 mW e 7% a 100 mW]. Uma completa recuperação da espessura corneana foi observada aos sete dias.

Conclusões. Foi possível desenvolver lesões corneanas de epitélio e estroma anterior de forma reprodutível. A espessura corneana reduziu-se de forma proporcional à intensidade do laser e os leucomas foram observados fundamentalmente quando utilizadas altas intensidades.

As córneas foram recuperadas em todos os casos em uma semana

Subsidios: SECYT UNC, CONICET PIP; FON-CYT PICT.

Queratitis fototérmica en cobayos inducida por diferentes tipos de láseres

Crim N^o, Monti R^o, Espósito E^o, Correa L^o, Sambuelli R^o, Suárez MP^o, Serra HM^o, Urretz Zavalía JA^o

^aServicio de Oftalmología, Clínica Universitaria Retiro Palóla, Universidad Católica de Córdoba.

^bServicio de Anatomía Patológica, Clínica Universitaria Retiro Palóla, Universidad Católica de Córdoba.

^cCIBICI-CONICET, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, meolaser@unbcba.com

Objetivo. Evaluar la lesión corneal producida por diferentes láseres en los ojos de cobayos para aproximarse a un modelo animal experimental de queratitis fototérmica.

Materiales y métodos. Se utilizaron cobayos pigmentados siguiendo las normas para cuidado de animales de ARVO. Los animales fueron divididos en 4 grupos experimentales n=2 y uno control. Cada grupo experimental fue tratado con distintos tipos de láseres: El grupo 1 con láser de argón (G1-A), grupo 2 con láser dióxido de carbono (G2-CO2), grupo 3 con láser diodo (G3-Di) y el grupo 4 con láser Nd-Yag (G4-NY). Los animales fueron anestesiados con xilacina 50 mg/kg (subcutánea) y con proparacaina (tópica ocular) y sus córneas expuestas a distintas intensidades de cada uno de los láseres.

Los daños provocados fueron evaluados mediante biomicroscopia (BMC) y una hora después de la lesión corneal se procedió a eutanasia de los animales utilizando xilacina intracardiaca a dosis de 100 mg/kg.

Las córneas fueron extraídas y estudiadas mediante microscopia óptica (MO) con tinción de hematoxilina-eosina (HE).

Resultados. LA BMC reflejó evidencia de erosiones superficiales y úlceras según el láser y la potencia utilizada. En la anatomía patológica se evidenció daño de todas las capas de la córnea (desde el epitélio corneal hasta endotelio) con todos los láseres y disparos, excepto en el G1-A1, donde se preservó el endotelio corneal.

Conclusiones. Solo en G1-A1 se produjo un daño que no alteraba configuración del endotelio corneal, siendo alterado el epitélio y el estroma medio y an-

terior, donde se produjo un haz de impacto $24,05 \pm 12,02$ micras. Es necesario aumentar el número de ojos para confirmar la reproducción del daño corneal.

Subsidio. SECYT, UNC.

Photothermal keratitis induced by different lasers in guinea pigs

Objective. To evaluate corneal injuries caused by different lasers in guinea pig eyes in an attempt to achieve an experimental animal model of photothermal keratitis.

Material and methods. Pigmented guinea pigs were used according to the ARVO guidelines for animal research. Animals were divided into 4 experimental groups (n= 2) and one control group. Each experimental group was treated with different types of lasers. Group 1 received treatment with argon laser (G1-A), group 2, with carbon dioxide laser (G2-CO2), group 3 was treated with diode laser (G3-Di) and group 4, with Nd-Yag laser (G4-NY). Animals were anesthetized with xylazine (50 mg/kg, administered subcutaneously) and with proparacaine (topical eyedrops) and their corneas were exposed at different intensities for each laser type.

Damage caused was evaluated by biomicroscopy (BMC) and the guinea pigs were euthanized using intracardiac xylazine at doses of 100 mg/kg one hour after the corneal injury was induced.

The corneas were removed and studied by optical microscopy (OM) using hematoxylin-eosin (HE) staining.

Results. BMC evidenced the presence of superficial erosions and ulcers according to the laser and power used. Pathologic anatomy revealed damage to all the corneal layers (from the corneal epithelium to the endothelium) with all lasers and shots, except for G1-A1, with which the corneal endothelium was preserved.

Conclusions. Only in G1-A1 the damage caused did not alter the configuration of the corneal endothelium, but there was alteration of the epithelium and medium and anterior stroma, where the beam produced an impact of $24,05 \pm 12,02$ microns. A greater number of eyes is needed to confirm the reproduction of corneal damage.

Support. SECYT, UNC.

Ceratite fototérmica em cobaias induzida por diferentes tipos de laser

Objetivo. Avaliar a lesão corneana produzida por diferentes tipos de laser nos olhos de cobaias para aproximar-se a um modelo animal experimental de ceratite fototérmica.

Materiais e métodos. Foram utilizadas cobaias pigmentadas seguindo as normas para o cuidado dos animais ARVO. Os animais foram divididos em 4 grupos experimentais n=2 e um controle. Cada grupo experimental foi tratado com diferentes tipos de laser. O grupo 1 com laser de argônio (G1-A), grupo 2 com laser dióxido de carbono (G2-CO2), grupo 3 com laser diodo (G3-Di) e o grupo 4 com laser Nd-Yag (G4-NY). Os animais foram anestesiados com xilazina 50 mg/kg (subcutânea) e com propacaina (tópica ocular) e suas córneas foram expostas a diferentes intensidades de cada um dos laser.

Os danos provocados foram avaliados mediante biomicroscopia (BMC) e uma hora depois da lesão corneana foi realizada eutanásia dos animais utilizando xilazina por via intracardíaca em doses de 100 mg/kg.

As córneas foram extraídas e estudadas mediante microscopia óptica (MO) com coloração hematoxilina-eosina (HE).

Resultados. A BMC mostrou evidência de erosões superficiais e úlceras segundo o laser e a potência utilizada.

Na anatomia patológica foi evidente o dano de todas as camadas da córnea (desde o epitélio corneano até o endotélio) com todos os laser e disparos, exceto no G1-A1, onde o endotélio corneano foi preservado.

Conclusões. Apenas em G1-A1 foi produzido um dano que não alterava a configuração do endotélio corneano, mas provocou alterações no epitélio e no estroma médio e anterior onde apresentou-se um feixe de impacto $24,05 \pm 12,02$ micra. É preciso aumentar o número de olhos para confirmar a reprodução do dano da córnea.

Subsídios. SECYT, UNC.

Citocinas y gelatinasas de epitelio corneal en queratopatía climática

Serra HM¹, Suárez MP, Robciuc A, Holopainen J², Utrera Zavala JA³

¹CTBICI-CONICET, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba

²Helsinki EyeLab, Department of Ophthalmology, University of Helsinki, Helsinki, Finland

³Centro de la Visión, Clínica Universitaria Reina Fabiola, Universidad Católica de Córdoba

hserra@mail.iqo.unc.edu.ar

Objetivo. La queratopatía climática (QPC) es una enfermedad degenerativa de la córnea caracterizada por un opacificación progresiva que se produce en individuos expuestos a altos niveles de irradiación ultravioleta B (RUV-B). Hemos demostrado previamente un aumento en gelatinasas y citoquinas proinflamatorias en lágrimas de estos pacientes. En este estudio investigamos la expresión de MMP-2 y 9 en biopsias de QPC y los efectos de RUV-B sobre células epiteliales corneales humanas (ECH).

Metodología. Se tiñeron las córneas de pacientes afectados con QPC y una córnea normal con hematoxilina-eosina, y la presencia y distribución de MMP-2 y MMP-9 se examinó utilizando inmunohistoquímica. Secreción de gelatinasas y citoquinas se midió en sobrenadante de las células ECH luego de haberlas expuesto a radiación RUV-B, utilizando inmunotransferencia, zimografía y arreglo de proteínas.

Resultados. Los estudios de inmunohistoquímica mostraron que MMP-2 se expresó en la membrana basal en el control y córneas afectadas, pero también marcadamente en los bordes de los depósitos granulares de QPC. La expresión de MMP-9 estuvo restringida a las capas basales del epitelio y se indujo notablemente en las córneas con QPC. La exposición de células de ECH a UVB aumentó la secreción de gelatinasas con un efecto sorprendente sobre la MMP-9 y fue precedida por la liberación de citoquinas proinflamatorias.

Conclusión. Se demuestra que el epitelio corneal podría participar en el desarrollo de QPC como fuente de citoquinas y gelatinasas. Además, en las células de ECH, la radiación UVB modula citoquinas y la posterior secreción de MMP. La inhibición local de la secreción de citoquinas y gelatinasas podría prevenir la progresión de QPC.

Subsidio. SECYT UNC; CONICET PIP; FONCYT PICT.

Cytokines and gelatinases from corneal epithelium in climatic droplet keratopathy

Objective. Climatic droplet keratopathy (CDK) is a degenerative disease of the cornea characterized by veiling, which occurs in individuals exposed to high levels of ultraviolet B (UVB) radiation. We have previously demonstrated an increase in proinflammatory gelatinases and cytokines in the tears of these patients. In this study we have investigated MMP-2 and MMP-9 expression in biopsies of CDK and the effects of UVB radiation on human corneal epithelial (HCE) cells.

Methodology. The corneas of CDK patients and a normal cornea were hematoxylin-eosin stained and the presence and distribution of MMP-2 and MMP-9 were examined using immunohistochemistry. Gelatinase and cytokine secretion was measured in tears and supernatant from HCE cells after exposure to UVB radiation by immunotransfer, zymography and protein arrangement.

Results. Immunohistochemistry evidenced that MMP-2 was expressed at the basement membrane in both control and affected corneas, but also markedly at the edges of the granular CDK deposits. MMP-9 expression was restrained to basal layers of the epithelium and was markedly induced in CDK corneas. Exposure of HCE cells to UVB radiation increased gelatinase secretion, with a striking effect on MMP-9, and was preceded by pro-inflammatory cytokine release.

Conclusion. We have demonstrated that the corneal epithelium might have a role in the development of CDK as a source of cytokines and gelatinases. Additionally, in HCE cells, UVB radiation modulates cytokine and subsequent MMP secretion. Local inhibition of cytokine and gelatinase secretion may prevent CDK progression.

Supports. SECYT UNC; CONICET PIP; FONCYT PICT.

Citocinas e gelatinasas do epitélio corneano em ceratopatía climática

Objetivo. A ceratopatía climática (QPC) é uma doença degenerativa da córnea caracterizada por uma opacificação progressiva produzida em indivíduos expostos a altos níveis de irradiação ultravioleta B (RUV-B). Temos demonstrado previamente um aumento das gelatinasas e citoquinas pro-inflamatórias em

lágrimas desses pacientes. Neste estudo pesquisamos a expressão de MMP-2 e 9 em biópsias de ceratopatia climática (QPC) e os efeitos de RUV-B sobre células epiteliais corneanas humanas (ECH).

Metodologia. Foram coloadas as córneas de pacientes afetados com ceratopatia climática e uma córnea normal com hematoxilina-eosina, e a presença e distribuição de MMP-2 e MMP-9 foi examinada utilizando imuno-histoquímica. A secreção de gelatinases e citosinas foi medida em sobrenadante das células epiteliais corneanas humanas depois de ter sido expostas à radiação RUV-B, utilizando imunotransferência, zimografia e arranjo de proteínas.

Resultados. Os estudos de imuno-histoquímica mostraram que o MMP-2 expressou-se na membrana basal no controle e nas córneas afetadas, mas também significativamente nas bordas dos depósitos granulares de ceratopatia climática. A expressão de MMP-9 foi restrita às camadas basais do epitélio e induzida notavelmente nas córneas com ceratopatia climática. A exposição de células epiteliais corneanas humanas aos UVB aumentou a secreção de gelatinases com um efeito surpreendente sobre a MMP-9 e foi precedida pela liberação de citocinas pró-inflamatórias.

Conclusão. Demonstra-se que o epitélio corneano poderia participar no desenvolvimento da ceratopatia climática como fonte de citocinas e gelatinases. Além disso, nas células epiteliais corneanas humanas, a radiação UVB modula citocinas e a posterior secreção de MMP. A inibição local da secreção de citocinas e gelatinases poderia prevenir a progressão da ceratopatia climática.

Subsidios. SECYT UNC; CONICET PIP; FONCYT PICT.

Nuevo ciclo visual en la retina interna de pollo

Diya NM¹, Vera DM¹, Valdez DJ¹, Bette BS¹, Tsai AT², Guño ME¹

¹CIQUIBIC-CONICET, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba

²Biology, University of Texas at San Antonio, San Antonio, Texas.

Antecedentes. Previamente reportamos que los pollos GUCY 1, modelo aviar de la amaurosis congénita de Leber, presentaban respuestas a la luz mediada por la retina interna así en ausencia de conos y bastones funcionales: respuestas presumiblemente mediadas

por células ganglionares intrínsecamente fotosensibles (ipRGCs) que expresan el fotopigmento melanopsina. Los fotopigmentos no visuales responsables de tal fotosensibilidad podrían utilizar un ciclo visual de regeneración del cromóforo independiente de la capacidad de biosintetizarlo.

Objetivo. Nuestro estudio se enfoca en investigar el ciclo de regeneración que puede tener lugar en las ipRGCs. Para esto investigamos la expresión y la actividad enzimática de diferentes enzimas involucradas con el ciclo visual clásico de regeneración del cromóforo en la retina interna de pollos WT.

Metodología. Pollos WT jóvenes adaptados a oscuridad fueron expuestos a 30 m de luz o mantenidos en oscuridad y sacrificados en luz roja tenue. Los ojos fueron diseccionados y liofilizados, y las diferentes capas de la retina fueron obtenidas por el método de cinta Scotch. Las muestras se procesaron para extracción de ARN, RT-PCR, inmunohistoquímica. Los retinoides fueron extraídos y medidos por HPLC.

Resultados. Los niveles de 11-cis retinal (RAL) fueron más altos en las capas de RGCs y nuclear interna en condiciones de luz respecto de oscuridad, mientras que los fotorreceptores presentaron un comportamiento opuesto y esperado para este tipo de células. Para identificar el origen del aumento de 11-cis RAL en presencia de la luz estudiamos la proteína fotosensibilizadora RGR, la cual posee la capacidad de generar 11-cis RAL a partir de All-trans RAL en presencia de luz. RGR se expresa a lo ancho de la retina, presentando una marca intensa en la capa de células ganglionares. RGR colocalizó con marcadores específicos de células gliales de Müller. También se estudió la actividad de las enzimas ARAT e isomerasa II, las cuales participan en la regeneración del cromóforo en las células de Müller. Se encontró actividad ARAT en todas las capas de la retina, mientras que la actividad isomerasa II se localizó en fotorreceptores y capa nuclear interna.

Conclusión. Estos resultados nos sugieren que RGR podría participar en la regeneración del cromóforo 11-cis RAL en condiciones de exposición a la luz, dando así lugar a un nuevo ciclo visual de la retina interna del pollo.

Subsidios. FONCYT (PICT 2004 no. 967 y PICT Bicentenario 2010 no. 647), CONICET, SECYT-UNC, MinCyT de Córdoba.

A novel visual cycle in the inner retina of chickens

Background. We have previously reported that GUCY 1 chickens, an avian model of Leber congeni-

tal amaurosis, had inner retina-mediated light responses even in the absence of functional rods and cones. These responses are presumably mediated by intrinsically photosensitive retinal ganglion cells (ipRGCs) that express the photopigment melanopsin. Non-visual photopigments responsible for such photosensitivity might use a visual cycle of chromophore regeneration independent of biostability capacity.

Objective. Our study focuses on the investigation of the regeneration cycle that can take place in ipRGCs. For such purpose, we have investigated the expression and enzymatic activity of different enzymes involved in the classical visual cycle of chromophore regeneration in the inner retina of wild-type (WT) chickens.

Methods. Dark-adapted young WT chickens were exposed to 30 min of light or kept in the dark and euthanized under dim red light. Eyes were dissected and lyophilized and the different retinal layers were obtained using the Scotch tape method. Samples were processed for RNA extraction, RT-PCR and immunohistochemistry. Retinoids extracted were analyzed by HPLC.

Results. 11-cis-retinal (RAL) levels were higher in the RGCs and inner nuclear layers under light vs. dark conditions, while photoreceptors elicited the opposite behavior, which was expected for this type of cells. In order to identify the origin of 11-cis RAL increased levels in the presence of light, we have studied the photoisomerase retinal G-protein-coupled receptor (RGR), which has the ability to generate 11-cis-RAL from all-trans-RAL in the presence of light. The RGR is expressed across the retina, with an intense mark in the ganglion cell layer. RGRs co-localized with specific markers for Müller glial cells. We also studied the activity of ARAT enzymes and isomerase II, which have a role in chromophore regeneration of Müller cells. All retinal layers evidenced ARAT activity, while isomerase II activity was localized in photoreceptors and inner nuclear layer.

Conclusion. These results suggest that RGRs might have a role in chromophore 11-cis RAL regeneration under conditions of light exposure, thereby originating a new visual cycle of the inner retina of chickens.

Support. FONCyT (PICT 2004 no. 967 and PICT Bicentenario 2010 no. 647), CONICET, SeCyT-USNC, MinCyT of Córdoba.

Novo ciclo visual na retina interna do frango

Antecedentes. Previamente relatamos que os frangos GUCY 1, modelo aviário da amaurose congênita de

Leiber, apresentavam respostas à luz mediada pela retina interna mesmo em ausência de cones e bastonetes funcionais: respostas presumivelmente mediadas por células ganglionares intrinsecamente fotosensíveis (ipRGCs) que expressam o fotopigmento melanopsina. Os fotopigmentos não visuais responsáveis dessa fotosensibilidade poderiam utilizar um ciclo visual de regeneração do cromóforo independente da capacidade de biestabilidade.

Objetivo. Nosso estudo é focado na pesquisa do ciclo de regeneração que pode ocorrer nas ipRGCs. Para isso, pesquisamos a expressão e a atividade enzimática de diferentes enzimas envolvidas no ciclo visual clássico da regeneração do cromóforo na retina interna de frangos WT.

Métodos. Frangos WT jovens adaptados à escuridão foram expostos a 30 m de luz ou mantidos na escuridão e sacrificados sob luz vermelha tênue. Os olhos foram dissecados e liofilizados e as diferentes camadas da retina foram obtidas pelo método de fita adesiva Scotch. As amostras foram processadas para extração de ARN, RT-PCR, imuno-histoquímica. Os retinóides foram removidos e medidos por HPLC.

Resultados. Os níveis de 11-cis retinal (RAL) foram mais altos nas camadas de RGCs e na camada nuclear interna em condições de luz a respeito da escuridão; enquanto, os fotorreceptores apresentaram um comportamento oposto e esperado para esse tipo de células. Para identificar a origem do aumento de 11-cis RAL em presença da luz estudamos a proteína fotoisomerasa RGR, a qual possui a capacidade de gerar 11-cis RAL a partir de All-trans RAL em presença de luz. RGR se expressa ao longo da retina, apresentando uma marca intensa na camada de células ganglionares. RGR co-localizou com marcadores específicos de células gliais de Müller. Também foi estudada a atividade das enzimas ARAT e isomerase II, as quais participam na regeneração do cromóforo nas células de Müller. Foi encontrada atividade ARAT em todas as camadas da retina, enquanto a atividade isomerase II foi localizada em fotorreceptores e na camada nuclear interna.

Conclusão. Esses resultados sugerem que RGR poderia participar na regeneração do cromóforo 11-cis RAL em condições de exposição à luz, possibilitando, assim, um novo ciclo visual da retina interna do frango.

Subsídios. FONCyT (PICT 2004 no. 967 y PICT Bicentenario 2010 no. 647), CONICET, SeCyT-UNC, MinCyT de Córdoba.

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

Monera LR, Díaz NM, Guido ME

CIQUIBIC-CONICET, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba. Luis.p.monera@unq.edu.ar

Antecedentes. Las células ganglionares de la retina (CGR) que expresan el fotopigmento melanopsina (OPN4) son intrínsecamente fotosensibles. En la retina de pollo han sido descritos 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 (HC).

Objetivos. El propósito de este trabajo fue purificar las HC 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 inmunquímica y morfología celular. Las fases se examinaron con anticuerpos específicos contra *Opn4x*, marcadores de HC (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 fueron analizados por RT-PCR.

Resultados. Sólo la fracción del gradiente correspondiente al 2.5% de BSA contuvo el mayor porcentaje de HC. Basados en un detallado análisis morfológico se encontró que las células de esta fracción se asemejan a HC 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 200 kDa (NF200) y presentan procesos que se asemejan morfológicamente a los de las CGR. 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 HC.

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

Subsidios. ANPCyT-FONCyT PICT Bicentenario 2010 no. 647, PICT, CONICET, SeCyT-UNC y MinCyT de Córdoba.

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

Background. Retinal ganglion cells (RGCs) expressing the photopigment melanopsin (OPN4) are intrinsically photosensitive. Two OPN4 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).

Objectives. 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.

Conclusiones: 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.

Support: ANPCyT-FONCyT PICT Bicentenario 2010 no. 647, PICT, CONICET, SeCyT-UNC and MinCyT of Córdoba.

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

Antecedentes: As células ganglionares da retina (CGR) que expressam o fotopigmento melanopsina (OPN4) são intrinsecamente fotossensíveis. Na retina do frango tem sido descritos dois genes de OPN4. *Opn4x* e *Opn4m*. Foi demonstrado que a expressão de *Opn4m* limita-se apenas à camada de GCRs, enquanto *Opn4x* muda ao longo do desenvolvimento: até o dia embrionário oito (E8) limita-se à camada em formação de CGRs e ao nervo óptico, enquanto, a partir do E15 aparece principalmente em células horizontais (HC).

Objetivo: O propósito deste trabalho foi purificar as células horizontais (HC) da retina do frango, obter culturas primárias altamente enriquecidas nestas células e caracterizá-las.

Métodos: Retinas de embriões de frango de E15 foram desagregadas e submetidas a um gradiente descontínuo de 1 a 4% de albumina de soro bovino (BSA). As células coletadas das diferentes fases foram cultivadas durante 4 dias e caracterizaram-se por imunocímica e morfologia celular. As fases foram examinadas com anticorpos específicos contra *Opn4x*, marcadores de HC (*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 contém a maior percentagem de HC. Baseados em uma detalhada análise morfológica, encontrou-se que as células dessa fração são semelhantes a HC tipo H1 e H3. A imunoreatividade de *Opn4x* foi observada nas culturas das células provenientes tanto da fase 2,5 quanto da fase de 3% de BSA. Convém destacar que a fase 3% contém células que expressam o filamento neuronal 200 kDa (NF200) e apresentam processos semelhantes

morfologicamente aos das CGR. A análise por citometria de fluxo demonstrou que um 30% das células na desagregação da 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 HC.

Conclusiones: Por meio desse método separamos seletivamente HC e conseguimos culturas altamente enriquecidas nessas células que expressam o fotopigmento *OPN4x*.

Subsidios: ANPCyT-FONCyT PICT Bicentenario 2010 no. 647, PICT, CONICET, SeCyT-UNC e MinCyT de Córdoba.

Preservación del sistema visual no formador de imágenes en la diabetes tipo 1 experimental en ratas

Sande PH, Fernández DC, Zavala N, Belforte N, Dorfman D, Rosenstein RE.

Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, CIPYBO-CONICET, p. zavala@yale.com

Objetivo: Examinar el sistema visual no formador de imágenes en una etapa avanzada de diabetes experimental en ratas.

Métodos: Se inyectó estreptozotocina (60 mg/kg) o vehículo en ratas *Wistar* macho adultas. Un grupo de animales se sometió a lensectomía (remoción del cristalino) bilateral. Se evaluó la función retinal (electrorretinograma, ERG) y de la vía visual (potenciales visuales evocados, PVE), el número de células ganglionares y melanopsina(+) (inmunohistoquímica de *Brd3a* y melanopsina) y los niveles de melanopsina (*western blot*). Se examinó el transporte anterógrado de la subunidad beta de la toxina del cólera al cálculo superior (CS), los núcleos supraquiasmáticos (NSQ) y el núcleo pretectal olivar (NPO). Se determinó el reflejo pupilar (1200 lux por 30 s) y la inducción de c-fos en los NSQ (por inmunohistoquímica). Se registraron ritmos diarios de actividad locomotora.

Resultados: A las 15 semanas de diabetes, el ERG y los PVE disminuyeron significativamente y todos los animales desarrollaron cataratas maduras. El número de células *Brd3a*(+) y las proyecciones al CS disminuyeron significativamente, pero no se observaron

diferencias en el número de células melanopsina(+) en los niveles de melanopsina y en las proyecciones retinales a los NSQ y al NPO. El reflejo pupilar aferente se conservó luego de 10 semanas de diabetes. A las 15 semanas de diabetes disminuyó la expresión de *c-Fos* en los NSQ inducida por luz. En los animales diabéticos se conservó el ritmo diario de actividad locomotora, aunque se observó un aumento en el tiempo necesario para la resincronización luego de un retraso de fase (4 horas). La lensectomía revertió significativamente la reducción en la expresión de *c-Fos* y en la resincronización del ritmo de actividad locomotora inducida por diabetes.

Conclusion. Estos resultados sugieren que el sustrato neuronal de sistema visual no formador de imágenes se preserva en etapas avanzadas de diabetes y que la lensectomía podría restaurar las alteraciones circadianas inducidas por diabetes experimental.

Subsidios. ANPCyT, UBA, CONICET.

Non-image-forming visual system preservation in experimental type 1 diabetes in rats

Objetivos. To examine the non-image-forming visual system in an advanced stage of experimental diabetes in rats.

Methods. Streptozotocin (60 mg/kg) or vehicle was injected to adult male *Wistar* rats. A group of these rats underwent bilateral lensectomy (crystalline lens removal). Retinal (electroretinogram, ERG) and visual pathway (visual evoked potentials, VEP) function, number of ganglion cells and of melanopsin(+) cells (Brn3a immunohistochemistry and melanopsin) and melanopsin levels (Western blot) were examined. Anterograde transport of the cholera toxin beta subunit to the superior colliculus (SC), supra-chiasmatic nuclei (SCN) and olivary pretectal nucleus (OPN) was assessed. The pupillary light reflex (1200 lux per 30 sec) and *c-Fos* induction in the SCN (by immunohistochemistry) were determined. Circadian locomotor activity rhythms were recorded.

Results. After 15 weeks of diabetes induction, ERG and VEP had decreased significantly and all rats had developed mature cataract. The number of Brn3a(+) cells and projections to the SC were reduced significantly, but no differences were found in the number of melanopsin(+) cells, melanopsin levels and retinal projections to the SCN and OPN. The afferent pupillary reflex was conserved after 10 weeks of diabetes. After 15 weeks of diabetes, light-induced *c-Fos* expression in the SCN had decreased. In diabetic

animals, the circadian rhythm of locomotor activity was conserved, though there was an increase in the time needed to re-entrainment after a phase delay (4 hours). Lensectomy significantly reversed the diabetes-induced reduction in *c-Fos* expression and in re-entrainment to the locomotor activity rhythm.

Conclusion. These results suggest that the neuronal substrate of the non-image forming visual system is preserved at advanced stages of diabetes and that lensectomy could restore circadian alterations induced by experimental diabetes.

Supports. ANPCyT, UBA, CONICET.

Preservação do sistema visual não formador de imagens na diabetes tipo 1 experimental em ratos

Objetivos. Examinar o sistema visual não formador de imagens numa etapa avançada de diabetes experimental em ratos.

Métodos. Foi injetada estreptozotocina (60 mg/kg) ou veículo em ratos *Wistar* macho adultos. Um grupo de animais foi submetido a lensectomia (remoção do cristalino) bilateral. Foi avaliada a função da retina (eletroretinograma, ERG) e da via visual (potenciais visuais evocados, PVE), o número de células ganglionares e melanopsina(+) (imuno-histoquímica de Brn3a e melanopsina) e os níveis de melanopsina (*western blot*). Foi examinado o transporte anterógrado da subunidade beta da toxina da cólera ao colículo superior (CS), os núcleos supraquiasmáticos (NSQ) e o núcleo pretectal olivar (NPO). Foi determinado o reflexo pupilar (1200 lux por 30 s) e a indução de *c-fos* nos NSQ (por imuno-histoquímica). Foram registrados ritmos diários de atividade locomotora.

Resultados. Após 15 semanas de diabetes, o ERG e os PVE diminuíram significativamente e todos os animais desenvolveram cataratas maduras. O número de células Brn3a(+) e as projeções ao CS diminuíram significativamente, mas não foram observadas diferenças no número de células melanopsina(+), nos níveis de melanopsina e nas projeções retiniais aos NSQ e ao NPO. O reflexo pupilar aferente foi conservado depois de dez semanas de diabetes. Às 15 semanas de diabetes diminuiu a expressão de *c-Fos* nos NSQ induzida por luz. Nos animais diabéticos conservou-se o ritmo diário de atividade locomotora, embora tenha sido observado aumento no tempo necessário para a resincronização depois de um retardo de fase de (quatro horas). A lensectomia revertiu significativamente a redução na expressão de *c-Fos* e na resincroni-

nización do ritmo de actividade locomotora inducida por diabetes.

Conclusión: Estes resultados sugeren que o substrato neuronal do sistema visual non formador de imáxenes é preservado en etapas avanzadas de diabetes e que a lensectomía podería restaurar as alteracións circadianas inducidas por diabetes experimental.

Subsidios: ANPCyT, UBA, CONICET.

Efecto de la isquemia retinal sobre el sistema visual no formador de imágenes

González Fleitas F, Dorfman D, Rosenstein RE

Laboratorio de Neuroquímica Betalínica y Oftalmología Experimental, Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, UBA, CEFyBO-CONICET.

flotgf_88@hotmail.com

Objetivo: Las células ganglionares retinales intrínsecamente fotosensibles (ipRGCs) que expresan el fotorpigmento melanopsina están involucradas en respuestas visuales no formadoras de imágenes, como la sincronización de los ritmos circadianos y el reflejo pupilar. En este trabajo examinamos el sistema visual no formador de imágenes en un modelo de isquemia retinal aguda y deletérea.

Métodos: En ratas *Wistar* macho adultas se indujo isquemia retinal por aumento de la presión intraocular a 120 mmHg durante 40 minutos. A los 14 días pos-isquemia se analizó el número total de células ganglionares y de células que expresan melanopsina (por inmunohistoquímica), los niveles de melanopsina (por *western blot*), el reflejo pupilar aferente (con estímulo de 1200 lux por 30 segundos) y el transporte anterógrado desde la retina al colículo superior y los núcleos supraquiasmáticos (NSQ) (por transporte de la subunidad beta de la toxina del cólera).

Resultados: La isquemia indujo una caída muy significativa en la amplitud de las ondas a y b del electroretinograma y del número de células ganglionares totales. Sin embargo, no se observaron diferencias en cuanto al número de células que expresan melanopsina ni a los niveles de este fotorpigmento. Las proyecciones retinales al colículo superior disminuyeron marcadamente en ojos isquémicos, pero se preservaron en forma notable las proyecciones retinales a los NSQ. El reflejo pupilar aferente no se modificó significativamente en ojos isquémicos.

Conclusiones: Estos resultados sugieren una particular resistencia del sistema visual no formador de imágenes en general y de las células ganglionares intrínsecamente fotosensibles y sus axones en particular frente a un daño retinal de magnitud como el inducido por una isquemia aguda.

Subsidios: ANPCyT, UBA, CONICET.

Effect of retinal ischemia on the non-image-forming visual system

Objectives: Intrinsically photosensitive retinal ganglion cells (ipRGCs) expressing the photopigment melanopsin are involved in non-image-forming visual responses, such as entrainment of circadian rhythms and pupillary light reflex. This paper examines the non-image-forming visual system in a model of acute and deleterious retinal ischemia.

Methods: Retinal ischemia was induced in adult male *Wistar* rats by increasing intraocular pressure to 120 mmHg for 40 minutes. Fourteen days after ischemia we analyzed: the total number of ganglion cells and melanopsin-expressing cells (by immunohistochemistry), melanopsin levels (by western blot), afferent pupillary reflex (with a stimulus of 1200 lux per 30 seconds) and anterograde transport from the retina to the superior colliculus and supraiasmatic nuclei (SCN) (by cholera toxin beta subunit transport).

Results: Ischemia induced a very significant drop in the electroretinogram a- and b-wave amplitudes and in the counts of total ganglion cells. However, there were no differences in the number of melanopsin-expressing cells, neither there was in the levels of this photopigment. Retinal projections to the superior colliculus decreased markedly in ischemic eyes, but retinal projections to the SCN were strikingly preserved. There was no significant change in the afferent pupillary reflex of ischemic eyes.

Conclusions: These results suggest that when there is extensive retinal damage such as the one induced by acute ischemia, there is a peculiar resistance of the non-image-forming visual system in general, and particularly of the intrinsically photosensitive ganglion cells and their axons.

Support: ANPCyT, UBA, CONICET.

Efeito da isquemia retiniana sobre o sistema visual não formador de imagens

Objetivos: As células ganglionares retinais intrínsecamente fotosensíveis (ipRGCs) que expresam o

fotopigmento melanopsina están involucradas en respuestas visuales no formadoras de imágenes, como la sincronización de ritmos circadianos e el reflejo pupilar. Neste trabalho examinamos o sistema visual não formador de imagens num modelo de isquemia retiniana aguda e delecérea.

Métodos. Em ratos *Wistar* macho adultos foi induzida isquemia retiniana por aumento da pressão intraocular a 120 mmHg durante 40 minutos. Aos 14 dias pós-isquemia foi analisado o número total de células ganglionares e de células que expressam melanopsina (por imuno-histoquímica), os níveis de melanopsina (por *western blot*), o reflexo pupilar aferente (com estímulo de 1200 lux por 30 segundos) e o transporte anterógrado a partir da retina para o colículo superior e os núcleos supraquiasmáticos (NSQ) (por transporte da subunidade beta da rodina da cólera).

Resultados. A isquemia induziu uma queda muito significativa na amplitude das ondas a e b do eletroretinograma e o número de células ganglionares totais. Contudo, não se observaram diferenças no número de células que expressam melanopsina nem nos níveis deste fotopigmento. As projeções retinianas ao colículo superior diminuíram marcadamente nos olhos isquémicos, mas se preservaram em forma notável as projeções retinianas aos NSQ. O reflexo pupilar aferente não foi modificado significativamente nos olhos isquémicos.

Conclusões. Estes resultados sugerem uma particular resistência do sistema visual não formador de imagens em geral e das células ganglionares intrinsecamente fotosensíveis e seus axônios em particular, frente a um dano da retina de magnitude como a induzido por uma isquemia aguda.

Subsidios. ANPCyT, UBA, CONICET.

Las neuronas de retina son capaces de sintetizar ácido docosahexaenoico a partir de ácido eicosapentaenoico para promover la diferenciación y supervivencia de los fotorreceptores

Agnolazza DL^a, Paliti LE^a, Agüero M^b, Anderson RE^a, Rotstein NP^a

^aInstituto de Investigaciones Bioquímicas, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca

^bUniversity of Oklahoma, Health Science Center, Estados Unidos.

Objetivo. La muerte de los fotorreceptores (FR) es un rasgo común a muchas enfermedades neurodegenerativas de la retina. Demostramos que el ácido docosahexaenoico (DHA), el ácido graso poliinsaturado más abundante en la retina, protege a los FR del daño oxidativo y promueve su diferenciación y que otro ácido poliinsaturado, el ácido eicosapentaenoico (EPA) presenta un efecto antiapoptótico y promotor de la diferenciación en los FR similar al DHA. El EPA es precursor metabólico del DHA en distintos tipos celulares. Esta síntesis ocurre en la retina, pero se desconoce aún si las neuronas pueden realizarla. Investigamos ahora si las neuronas de retina *in vitro* pueden sintetizar DHA a partir de EPA y si el EPA ejerce sus efectos por sí mismo o a través de su conversión a DHA.

Métodos. Cultivos neuronales de retina de rata se suplementaron o no con EPA y con otros ácidos grasos (palmitico, oleico, araquidónico) y se trataron a día 3 con los oxidantes paraquat (PQ) o H₂O₂. Para inhibir la síntesis de DHA, los cultivos se trataron con o sin CP24879, inhibidor de las $\Delta 5/\Delta 6$ desaturasas que participan en dicha síntesis, y luego con H₂O₂. La muerte celular se evaluó con ioduro de propidio, la apoptosis por DAPI y TUNEL y la integridad mitocondrial con Mitotracker. La diferenciación de los FR se analizó cuantificando expresión de opsinina y la composición de ácidos grasos por GLC.

Resultados. El agregado de EPA a los cultivos protegió a los FR de la apoptosis inducida por daño oxidativo y aumentó los niveles de DHA pero no los de EPA en los lípidos neuronales. Otros ácidos grasos no mostraron efecto protector en los FR. El agregado de CP24879, previo al de EPA, disminuyó los niveles de DHA en las neuronas, aumentando el de su precursor inmediato. Este inhibidor bloqueó el efecto protector e inductor de diferenciación del EPA.

Conclusiones. Estos resultados sugieren que el DHA, y no el EPA, sería responsable del efecto protector y promotor de diferenciación de los FR y evidencian por primera vez que neuronas aisladas de retina son capaces de elongar y desaturar al EPA para sintetizar el DHA.

Subsidios. ANPCYT, UNS y CONICET.

Retinal neurons synthesize docosahexaenoic acid from eicosapentaenoic acid to promote differentiation and survival in photoreceptors

Objectives. Photoreceptor (PR) death is a common feature to many neurodegenerative retinal diseases.

We have demonstrated that docosahexaenoic acid (DHA), the most abundant polyunsaturated fatty acid of the retina, protects PRs from oxidative damage and promotes their differentiation, and that another polyunsaturated acid, eicosapentaenoic acid (EPA) elicits antiapoptotic and differentiation-promoting effects in PRs, similar to that of DHA. EPA is the metabolic precursor of DHA in different cell types. This synthesis takes place in the retina, but whether neurons can generate it still remains unknown. The purpose of this study is to investigate if retinal neurons can synthesize DHA from EPA *in vitro* and if EPA exerts its effects by itself or via its conversion into DHA.

Methods. Rat retinal neuronal cultures were supplemented or not with EPA and other fatty acids (palmitic, oleic, arachidonic) and were treated on day 3 with paraquat oxidants (PQ) or H₂O₂. In order to inhibit DHA synthesis, cultures were treated with or without CP24879, $\Delta 5/\Delta 6$ desaturase inhibitor involved in this synthesis, and then with H₂O₂. Cell death was evaluated with propidium iodide, apoptosis, with DAPI and TUNEL, and mitochondrial integrity, by Mitotracker. PR differentiation was analyzed by quantification of opsin expression and the composition of fattyacids, by GLC.

Results. Addition of EPA to cultures protected PRs from oxidative damage-induced apoptosis and increased DHA levels, though not EPA levels, in neuronal lipids. Other fatty acids failed to evidence any PR-protective effect. Addition of CP24879, previous to EPA addition, reduced DHA levels in neurons, thereby increasing the levels of its immediate precursor. This inhibitor blocked the protective and differentiation-inducing effects of EPA.

Conclusions. These results suggest that DHA, but not EPA, may be responsible for the PR-protective and differentiation-promoting effects and they are the first evidence of neurons isolated from the retina that are able to elongate and desaturate EPA to synthesize DHA.

Support: ANPCYT, UNS and CONICET.

Os neurônios da retina podem sintetizar ácido docosahexaenoico a partir de ácido eicosapentaenoico para promover a diferenciação e sobrevivência de fotorreceptores

Objetivos. A morte dos fotorreceptores (FR) é um rasgo comum a muitas doenças neurodegenerativas da retina. Demonstramos que o ácido docosahexaenó-

ico (DHA), o ácido grasso poliinsaturado mais abundante na retina, protege aos FR do dano oxidativo e promove sua diferenciação e que outro ácido poliinsaturado, o ácido eicosapentaenóico (EPA) apresenta um efeito antiapoptótico e promotor da diferenciação nos FR semelhante ao DHA. O EPA é precursor metabólico do DHA em distintos tipos celulares. Essa síntese ocorre na retina, mas se desconhece ainda se os neurônios podem realizá-la. Pesquisamos agora se os neurônios de retina *in vitro* podem sintetizar DHA a partir do EPA e se o EPA exerce seus efeitos por ele mesmo o através da sua conversão a DHA.

Métodos. Culturas de neurônios de retina de rato suplementaram-se ou não com EPA e com outros ácidos graxos (palmitico, oleico, araquidônico) e foram tratados no dia três com os oxidantes paraquat (PQ) ou H₂O₂. Para inibir a síntese de DHA, as culturas foram tratadas com ou sem CP24879, inibidor das $\Delta 5/\Delta 6$ desaturase que participam nessa síntese, e depois com H₂O₂. A morte celular foi avaliada com ioduro de propídio, a apoptose por DAPI e TUNEL e a integridade mitocondrial com Mitotracker. A diferenciação dos FR foi analisada quantificando expressão de opsin e a composição de ácidos graxos por GLC.

Resultados. A adição de EPA às culturas protegeu os FR da apoptose induzida por dano oxidativo e aumentou os níveis de DHA, mas não os de EPA nos lipídios neuronais. Outros ácidos graxos não mostraram efeito protetor nos FR. O agregado de CP24879, prévio ao de EPA, diminuiu os níveis de DHA nos neurônios, aumentando o de seu precursor imediato. Este inibidor bloqueou o efeito protetor e indutor de diferenciação do EPA.

Conclusões. Esses resultados sugerem que o DHA, e não o EPA seria responsável pelo efeito protetor e promotor de diferenciação dos FR e evidenciam pela primeira vez que neurônios isolados de retina têm capacidade para elongar e desaturar o EPA para sintetizar o DHA.

Subsidios: ANPCYT, UNS e CONICET.

La exposición a la luz de las retinas bovinas modula positivamente la activación de la proteína quinasa C alfa (PKC α) y de la diacilglicerol quinasa (DAGK) en la fracción nuclear de fotorreceptores

Natalini PM, Maretti MV, Guisto NM, Urucheta de Basciani MG.

Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca (INIBIB-CONICET), Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, pmnalin@criba.edu.ar

Objetivos. El objetivo general del trabajo fue analizar el efecto de la exposición de retinas a la luz en la actividad de la diacilglicerol quinasa (DAGK) y de la proteína quinasa C (PKC) en una fracción rica en núcleos de células fotorreceptoras. Los objetivos particulares fueron: a) determinar si la luz, a través de la activación de una fosfolipasa tipo C (PIP₂-PLC), genera una respuesta nuclear en la actividad DAGK; b) determinar si la luz modifica el contenido y activación de PKC α ; c) evaluar la correlación del efecto lumínico sobre la actividad DAGK a dos temperaturas diferentes.

Materiales y métodos. Las retinas se obtuvieron de ojos bovinos adaptados durante 2 horas 30 minutos a oscuridad (0°C) y las copas fueron expuestas durante 15 minutos en oscuridad al inhibidor PIP₂-PLC, U73122 (10 μ m) o al vehículo (DMSO 0,01%) y luego expuestas durante 30 minutos a luz u oscuridad en dichas condiciones. Este procedimiento se realizó a 0° o a 22°. Las retinas fueron homogenizadas en sacarosa 0,25 M y combinadas con sacarosa 2,2 M para obtener un homogenado 1,6 M, sembrado sobre un gradiente de sacarosas 2,4 M-2,2 M y centrifugado 70 minutos a 25000 rpm. Se obtuvo un pellet altamente purificado en núcleos de células fotorreceptoras (FNF). La pureza del FNF se corroboró por microscopía electrónica y *western blot* (WB). La actividad DAGK en los núcleos de FNF se detectó midiendo la formación de PA durante 10 minutos de incubación empleando ATP γ 32P. El contenido de PKC α total y activada (fosfo PKC α) se detectó mediante WB.

Resultados. Los resultados mostraron que la luz estimula la formación de PA nuclear (67%) y que ese efecto fue revertido por la preincubación con el U73122. Cuando el procedimiento se realizó a 22°C los niveles de actividad detectada en el núcleo fueron superiores a los observados a 0° pero el efecto de la luz

y la reversión por U73122 fueron proporcionalmente similares. La luz provoca un aumento en el contenido nuclear de PKC α activada respecto de la condición de oscuridad, con niveles similares de PKC α total.

Conclusión. Los resultados indicarían que la exposición a la luz en retina *in vivo* genera una activación de la PKC α en los núcleos de fotorreceptores que se debe posiblemente al incremento del DAG producido de la activación de PIP₂-PLC, mientras que la transformación del DAG a PA por DAGK operaría como regulador negativo.

Subsidio. PIP (CONICET) y PGI (SGCyT, UNS).

Agradecimiento. A los Dres. Nora Rostein y Luis Politi por la provisión de anticuerpos.

Bovine retina exposure to light positively modulates the activation of protein kinase C alpha (PKC α) and diacylglycerol kinase (DAGK) in the photoreceptor nuclei fraction

Objective: The general goal of this study was to analyze the effect of retinal exposure to light in the activity of diacylglycerol kinase (DAGK) and protein kinase C (PKC) in a photoreceptor cell nuclei-rich fraction. The specific goals were to: a) determine whether light, through the activation of a phospholipase C (PIP₂-PLC) generates nuclear response in DAGK activity; b) to determine if light modifies PKC α contents and activation; c) to evaluate the correlation of the luminal effect on DAGK activity at two different temperatures.

Materials and methods. Retinas were obtained from dark-adapted bovine eyes after exposure of 2 hours 30 minutes to darkness (0°C); the cups were exposed during 15 minutes in the dark to PIP₂-PLC, U73122 (10 μ m) or vehicle (DMSO 0,01%) and subsequently to light or darkness for 30 minutes under the same conditions. This procedure was carried out at 0° or 22°. Retinas were homogenized in 0,25 M sucrose and combined with 2,2 M sucrose solution to obtain a 1,6 M homogenate layered on top of a sucrose gradient of 2,4 M-2,2 M and centrifuged for 70 min at 25000 rpm. A highly purified pellet in photoreceptor cell nuclei (PCN) was thus obtained. Purity of the PCN was verified by electron microscopy and western blot (WB). DAGK activity at PCN nuclei was detected by measuring PA formation during 10-min incubation using ATP γ 32P. The content of total and activated PKC α (phospho-PKC α) was detected by WB.

Results. The results evidenced that light stimulates nuclear PA formation (67%) and that this effect was

reversed by preincubation with U73122. When the procedure was performed at 22°C the activity levels detected in the nucleus were higher than those observed at 0°C, but the effect of light and U73122-induced reversion were proportionately similar. Light produces an increase in the nuclear content of activated PKC α with respect to dark conditions, with similar levels of total PKC α .

Conclusion. The results suggest that in situ retinal exposure to light may generate PKC α activation in the photoreceptor nuclei that might be due to the DAG increase as a consequence of PIP2-PLC activation, while DAG-to-PA conversion by DAGK could operate as a negative regulator.

Supports. PIP (CONICET) and PGI (SGCyT, UNS).

Acknowledgment. Nora Rotstein, M.D. and Luis Politi for the provision of antibodies.

A exposição à luz das retinas bovinas modula positivamente a ativação da proteína quinase C alfa (PKC α) e da diacilglicerol quinase (DAGK) na fração nuclear de fotorreceptores

Objetivos. O objetivo geral do trabalho foi analisar o efeito da exposição de retinas à luz na atividade da diacilglicerol quinase (DAGK) e da proteína quinase C (PKC) numa fração rica em núcleos de células fotorreceptoras. Os objetivos particulares foram: a) determinar se a luz, através da ativação duma fosfolipase tipo C (PIP2-PLC), gera uma resposta nuclear na atividade DAGK; b) determinar se a luz modifica o conteúdo e ativação de PKC α ; c) avaliar a correlação do efeito luminoso sobre a atividade DAGK em duas temperaturas diferentes.

Materiais y métodos. As retinas foram obtidas de olhos bovinos adaptados durante 2 horas 30 minutos a escuridão (0°C) e as copas foram expostas durante 15 minutos em escuridão ao inibidor PIP2-PLC, U73122 (10 μ m) ou ao veículo (DMSO 0,01%) e logo expostas durante 30 minutos à luz ou escuridão nessas condições. Esse procedimento foi realizado a 0°C ou a 22°C. As retinas foram homogeneizadas em sacarosa 0,25 M e combinadas com sacarosa 2,2 M para obter um homogenado 1,6 M, semeado sobre um gradiente de sacarosas 2,4 M-2,2 M e centrifugado 70 minutos a 25000 rpm. Obteve-se um pellet altamente purificado em núcleos de células fotorreceptoras (FNF). A pureza do FNF foi corroborada por microscopia electrónica e western blot (WB). A atividade DAGK nos núcleos de FNF foi detectada mediante a formação de PA durante 10 minutos de incubação

empregando ATP γ 32P. O conteúdo de PKC α total e ativada (fosfo PKC α) foi detectado por WB.

Resultados. Os resultados mostraram que a luz estimula a formação de PA nuclear (67%) e que esse efeito foi revertido pela pré-incubação com o U73122. Quando o procedimento foi realizado a 22°C os níveis de atividade detectada no núcleo foram superiores aos observados a 0°C, mas o efeito da luz e a reversão por U73122 foram proporcionalmente semelhantes. A luz provoca aumento no conteúdo nuclear de PKC α ativada a respeito da condição de escuridão, com níveis semelhantes de PKC α total.

Conclusão. Os resultados indicariam que a exposição à luz em retina in situ gera uma ativação da PKC α nos núcleos de fotorreceptores causada, possivelmente, pelo incremento do DAG produto da ativação de PIP2-PLC, enquanto a transformação do DAG para PA por DAGK operaria como regulador negativo.

Substâncias. PIP (CONICET) e PGI (SGCyT, UNS).

El ácido retinoico induce apoptosis y diferenciación en neuronas fotorreceptoras de retina activando la vía de la p38/MAPK

Politi LE, De Genaro P, Simon MV, Rotstein NP

Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca (INIBB-CONICET), Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, impoliti@cribio.edu.ar

Objetivo. El ácido retinoico (AR) juega un rol crucial en la diferenciación de distintos tejidos y es crítico durante el desarrollo del sistema nervioso, incluyendo la retina. Además, se ha mostrado que induce apoptosis en distintos tipos celulares. No se conocen con certeza los mecanismos por los cuales el AR induce estos efectos antagónicos. En este trabajo analizaremos los efectos del AR y los mecanismos que activa en neuronas de retina.

Métodos. Cultivos neuronales de retina de rata se trataron con AR al día 0 y al día 2 y se analizó el efecto del pretratamiento con o sin ácido docosahexaenoico (ADH), un factor de supervivencia para fotorreceptores (FR) y Z-VAD-FMK, un pan inhibidor de caspasas. A distintos tiempos se evaluaron parámetros de diferenciación y apoptosis. Para establecer si el AR activa la vía de p38/MAPK, se analizaron los nive-

los P-p38 en cultivos con y sin AR, y los efectos del agregado de SB203580, inhibidor específico de p38, mediante inmunocitoquímica y *western blot*.

Resultados: El agregado de AR a día 0, cuando los progenitores de FR permanecen en el ciclo celular, incrementó la apoptosis de los FR; esto no ocurrió cuando fue agregado al día 2, cuando los progenitores ya han salido del ciclo. El tratamiento con Z-VAD-FMK impidió la apoptosis inducida por AR. El AR incrementó selectivamente la expresión de opsina y periferina en los FR, independientemente del momento de su agregado, y estimuló el crecimiento axonal en FR y células amacriñas. El AR estimuló la rápida fosforilación de p38, mientras que el SB203580 bloqueó los efectos del AR en la expresión de opsina y apoptosis sin alterar el crecimiento axonal. Notablemente, la suplementación de los cultivos con ADH previno la apoptosis inducida por el AR.

Conclusiones: El AR promovió la diferenciación de los FR a distintos tiempos *in vitro* e indujo simultáneamente su apoptosis temprana sólo mientras existieron progenitores en proliferación. El AR activó la vía de p38/MAPK para estimular diferenciación y apoptosis de los FR, pero no para promover el crecimiento axonal, lo que sugiere que activaría distintas vías de señalización simultáneamente. La prevención de dicha apoptosis por el ADH sugiere la necesidad de una estricta coordinación de los factores de diferenciación, como el AR y supervivencia, como el ADH, para preservar el número adecuado de FR durante el desarrollo de la retina.

Subsidios: FONCYT, CONICET y UNS.

Retinoic acid induces apoptosis and differentiation of retinal photoreceptor neurons through p38/MAPK activation

Objetivo: Retinoic acid (RA) has a vital role in the differentiation of the different tissues and is critical during the nervous system development, including the retina. Furthermore, it has been demonstrated to induce apoptosis in different cell types. The mechanisms by which RA induces these antagonistic effects is unclear. This study analyzes the effects of RA and the mechanisms activated by it in retinal neurons.

Método: Rat retinal neuronal cultures were treated with RA on days 0 and 2 with subsequent analysis of the effect of pretreatment with or without docosahexaenoic acid (DHA), a survival factor for photoreceptors (PR) and Z-VAD-FMK, a pan-caspase inhibitor. Differentiation and apoptosis parameters

were evaluated at different time-points. To establish whether RA activates the p38/MAPK pathway, P-p38 levels were analyzed in cultures with and without RA, and the effects of addition of SB203580, a p38-specific inhibitor, were assessed by immunocytochemistry and western blot.

Results: RA addition on day 0, when PR progenitors remain in the cellular cycle, increased PR apoptosis; this did not occur with RA addition on day 2, when progenitors had already come out of the cycle. Treatment with Z-VAD-FMK prevented RA-induced apoptosis. RA selectively increased opsin and peripherin expression in the PRs, regardless of the time-point at which it was added, and stimulated axonal growth in PRs and amacrine cells. RA stimulated rapid p38 phosphorylation, while SB203580 blocked the effects of RA in opsin expression and apoptosis with no changes in axonal growth. Strikingly, DHA supplementation of cultures prevented AR-induced apoptosis.

Conclusion: RA promoted PR differentiation at different time-points *in vitro* and simultaneously induced their early apoptosis only while there were proliferating progenitors. RA activated the p38/MAPK pathway to stimulate PR differentiation and apoptosis, but not to promote axonal growth, thus suggesting that it might simultaneously activate signaling pathways. Prevention of the abovementioned DHA-induced apoptosis suggests the need for strict coordination of differentiation factors, such as RA; and survival, such as DHA, to preserve the adequate number of PRs during retinal development.

Support: FONCYT, CONICET and UNS.

O ácido retinoico induz apoptose e diferenciação em neurônios fotorreceptores de retina ativando a via da p38/MAPK

Objetivo: O ácido retinoico (AR) tem um papel fundamental na diferenciação de diversos tecidos e é fundamental durante o desenvolvimento do sistema nervoso, incluindo a retina. Além disso, foi mostrado que induz apoptose em diferentes tipos celulares.

Os mecanismos pelos quais o AR induz esses efeitos antagonísticos não são conhecidos com certeza.

Neste trabalho analisaremos os efeitos do AR e os mecanismos que ativa nos neurônios da retina.

Método: Culturas neuronais de retina de rato foram tratadas com AR no dia 0 e no dia 2 e foi analisado o efeito do pré-tratamento com ou sem ácido docosahexaenoico (ADH), um fator de sobrevivência para fotorreceptores (FR) e Z-VAD-FMK, um pan-

inibidor de caspases. Em diferentes momentos foram avaliados parâmetros de diferenciação e apoptose. Para estabelecer se o AR ativa a via de p38/MAPK, foram analisados os níveis P-p38 em culturas com e sem AR, e os efeitos do acréscimo de SB203580, inibidor específico de p38, mediante imunocitoquímica e *western blot*.

Resultados. O acréscimo de AR no dia zero, quando os progenitores de FR permanecem no ciclo celular, incrementou a apoptose dos FR; isso não ocorreu quando adicionado no dia 2, quando os progenitores já saíram do ciclo. O tratamento com Z-VAD-FMK impediu a apoptose induzida por AR. O AR aumentou seletivamente a expressão de opsina e periferrina nos FR, independentemente do momento da sua adição, e estimulou o crescimento axonal em FR e células amácrinas. O AR estimulou a rápida fosforilação de p38, enquanto o SB203580 bloqueou os efeitos do AR na expressão de opsina e apoptose sem alterar o crescimento axonal.

Notavelmente, a suplementação das culturas com ADH preveniu a apoptose induzida pelo AR.

Conclusões. O AR promoveu a diferenciação dos FR em diferentes tempos *in vitro* e induziu simultaneamente a apoptose precoce só enquanto existiram progenitores em proliferação. O AR ativou a via de p38/MAPK para estimular diferenciação e apoptose dos FR, mas não para promover o crescimento axonal, o que sugere que ativaria diferentes vias de sinalização simultaneamente. A prevenção dessa apoptose pelo ADH sugere a necessidade de uma estrita coordenação dos fatores de diferenciação, como o AR e sobrevivência, como o ADH, para preservar o número adequado de FR durante o desenvolvimento da retina.

Subsidios. FONCYT, CONICET e UNS.

Localización de dos isoformas del receptor de glucocorticoides en la retina del ratón

Marquioni Ramella MD, Culrilla MA, Salsano AM

Facultad de Ciencias Biomédicas, Universidad Austral, Pilar (Buenos Aires).

marquipro@cas.austral.edu.ar

Objetivo. Los glucocorticoides (GC) protegen a los fotorreceptores del daño provocado por iluminación excesiva mediante el receptor de glucocorti-

coides (GR). Se conocen dos isoformas principales de este receptor: GR α , el receptor nuclear clásico, y GR β , carente de ligandos conocidos, que actúa como inhibidor. Para investigar el rol de estos receptores en la protección de la retina determinamos su localización en retinas expuestas a distintas condiciones de iluminación.

Métodos. Empleamos ratones Balb-c de 5-7 semanas de edad, criados bajo iluminación cíclica (12 h 60 lux; 12 h oscuridad). Las retinas fueron estudiadas a mediodía y a medianoche o después de exposición a oscuridad prolongada (OP) durante 7 días, o a 1500 lux durante 6 horas. Se utilizaron anticuerpos específicos para cada isoforma (Dr. J. A Cidlowski), detectados en forma inmunohistoquímica.

Resultados. Bajo condiciones fisiológicas encontramos inmunoreactividad GR α (GR α -IR) en los núcleos celulares del epitelio pigmentario (EP), la nuclear externa y la nuclear interna (CNE y CNI). Los núcleos de las células de Müller mostraban más IR que otros núcleos de la misma capa. Se observó GR α -IR en la limitante externa (mle); los segmentos internos y terminales de la plexiforme externa (CPE). En estas localizaciones la IR fue más intensa al mediodía.

GR α -IR fue casi indetectable después de OP. Después de 1500 lux fue semejante a la del mediodía.

Detectamos GR β -IR en todas las capas nucleares de la retina neural. La GR β -IR de la mle y la CPE prácticamente desapareció después de OP. Después de 1500 lux, la GR β -IR fue semejante a la observada en horas del mediodía. El citoplasma del EP presentó intensa GR β -IR.

Conclusiones. La retina expresó ambas isoformas del GR. En la retina externa se encontró GR α tanto en localizaciones nucleares como no nucleares. La presencia de GR α -IR en la mle y en la CPE sugiere su asociación con acciones no genómicas. Curiosamente, estas dos localizaciones también mostraron abundante GR β -IR. Los núcleos de la CNI que presentaron intensa GR α -IR sugirieron una gran actividad genómica a nivel de las células de Müller, que no estaría bloqueada por la presencia de GR β . Por el contrario, la intensa GR β -IR del EP implicaría una fuerte función reguladora. El descenso de GR α -IR durante la oscuridad prolongada sugirió que los glucocorticoides endógenos sólo serían necesarios para la supervivencia de los fotorreceptores expuestos a la luz, aún en niveles fisiológicos.

Subsidio. PICTO-AUSTRAL 2008-00090

Localization of two glucocorticoid receptor isoforms in the murine retina

Objetivos. Glucocorticoids (GC) protect photoreceptors from damage caused by excess light via the glucocorticoid receptor (GR). There are two known main isoforms of this receptor: GR α , the classical nuclear receptor, and GR β , which has no known ligands, and acts as an inhibitor. To investigate the role of these receptors in retinal protection we have determined their location in retinas exposed to different lighting conditions.

Method. 5-7-week-Balb-c mice, reared under cyclic lighting (12 h 60 lux : 12 h darkness) were used. Retinas were studied at noon and midnight or after prolonged dark exposure (PD) for 7 days or to 1500 lux for 6 hours. Specific antibodies for each isoform (J.A. Sidlowski, M.D.), detected by immunoenzymatic assay, were used.

Results. Under physiologic conditions we found GR α immunoreactivity (GR α -IR) in the cell nuclei of the pigment epithelium (PE), outer nuclear layer (ONL) and inner nuclear layer (INL). Müller cell nuclei evidenced more IR than other nuclei of the same layer. There was GR α -IR in the external limiting membrane (elm), inner segments and terminals in the outer plexiform layer (OPL). In these locations, IR was more intense at noon. GR α -IR was almost undetectable after PD, whereas after 1500 lux it was similar to that of noon. We detected GR α -IR in all the nuclear layers of the neural retina. GR α -IR of the elm and OPL had almost disappeared after PD. After 1500 lux, GR β -IR was similar to that observed at noon. The PE cytoplasm had intense GR α -IR.

Conclusions. The retina expressed both GR isoforms. In the outer retina GR α was found both in nuclear localizations and in non-nuclear ones. The presence of GR α -IR in the elm and in the OPL suggests an association with non-genomic actions. Strikingly, both localizations also evidenced abundant GR β -IR. Intense GR α -IR evidenced in INL nuclei suggested high genomic activity at the level of Müller cells, apparently not blocked by the presence of GR β . Conversely, the intense GR β -IR of the PE might entail a strong regulatory function. GR α -IR decrease in prolonged darkness suggested that endogenous glucocorticoids would only be necessary for the survival of light-exposed photoreceptors, even at physiologic levels. **Support.** PICTO-AUSTRAL 2008-00090.

Localização de duas isoformas do receptor de glicocorticoides na retina do rato

Objetivos. Os glicocorticoides (GC) protegem os fotorreceptores do dano provocado pela iluminação excessiva mediante o receptor de glicocorticoides (GR). Duas isoformas principais são conhecidas neste receptor: GR α , o receptor nuclear clássico e GR β , carente de ligantes conhecidos, que age como inibidor. Para pesquisar o papel destes receptores na proteção da retina determinamos sua localização nas retinas expostas em diferentes condições de iluminação.

Metod. Utilizamos ratos Balb-c de 5-7 semanas de idade, criados sob iluminação cíclica (12 h 60 lux: 12 h escuridão). As retinas foram estudadas no meio-dia e na meia-noite ou depois de uma exposição à escuridão prolongada durante sete dias, ou a 1500 lux durante seis horas. Foram utilizados anticorpos específicos para cada isoforma (Dr. J. A. Sidlowski), detectados de forma imunoenzimática.

Resultados. Sob condições fisiológicas encontramos imunoreatividade GR α (GR α -IR) nos núcleos celulares do epitélio pigmentário (EP), a nuclear externa e a nuclear interna (CNE e CNI). Os núcleos das células de Müller mostravam mais IR do que os outros núcleos da mesma camada. Observou-se GR α -IR na limitante externa (mle), nos segmentos internos e terminais da plexiforme externa (CPE). Nessas localizações a IR foi mais intensa durante o meio-dia.

GR α -IR foi quase indetectável depois de depois de OP. Depois de 1500 lux foi semelhante a do meio-dia. Detectamos GR β -IR em todas as camadas nucleares da retina neural. A GR β -IR da mle e a CPE praticamente desapareceu depois da prolongada exposição à escuridão. Depois de 1500 lux, a GR β -IR foi semelhante à observada nas horas do meio-dia. O citoplasma do EP apresentou intensa GR β -IR.

Conclusões. A retina expressou ambas as isoformas do GR. Na retina externa foi encontrado GR α tanto em localizações nucleares quanto não nucleares. A presença de GR α -IR na mle e na CPE sugere sua associação com ações não genômicas. Curiosamente, essas duas localizações mostraram também abundante GR β -IR. Os núcleos da CNI que apresentaram intensa GR α -IR sugeriram uma grande atividade genômica no nível das células de Müller, que não estaria bloqueada pela presença de GR β . Pelo contrário, a intensa GR β -IR do EP implicaria uma forte função reguladora. O descenso de GR α -IR durante a escuridão prolongada sugeriu que os glicocorticoides endó-

genos apenas serían necesarios para la sobrevivencia de los fotorreceptores expuestos a luz, ainda em níveis fisiológicos.

Subsidio: PICTO-AUSTRAL 2008-00090.

Expresión de alfa-1-antitripsina (A1AT) en la retina de ratas diabéticas y no diabéticas

Ortiz GA, Mancini JE, Gallo JE

Nanomedicine & Vision Group, Facultad de Ciencias Biomédicas, Universidad Austral.

Servicio de Oftalmología, Hospital Universitario Austral, Pilar (Buenos Aires)

g.ortiz@yahoo.com.ar

Introducción. La retinopatía diabética (RD) es la causa más frecuente de ceguera en la población en edad laboral. Los procesos inflamatorios son de relevancia debido a la posibilidad de causar ceguera. Las herramientas clásicas que dispone el oftalmólogo para limitar la reacción inflamatoria están circunscriptas a dos tipos de drogas: los antiinflamatorios no esteroideos (AINES) y los corticoides. Ambas drogas son efectivas y bastante bien toleradas en procesos inflamatorios agudos. Sin embargo, el problema aparece cuando se requiere de la administración prolongada, surgiendo entonces efectos indeseables relevantes tanto locales como sistémicos. En este trabajo se desea evaluar la utilización de la alfa-1-antitripsina (A1AT) como antiinflamatorio endógeno.

Propósito. Identificar la presencia de la alfa-1-antitripsina (A1AT), un inhibidor de serino proteasas (*serpin*), en la retina de las ratas diabéticas y no diabéticas.

Métodos. Al segundo día de la vida las ratas Wistar neonatales recibieron una inyección intraperitoneal de estreptozotocina (STZ). Se clasificaron como ratas diabéticas aquellas que luego de 2 días desde la inducción con STZ tenían una glucemia mayor a 200mg/dl. Grupos de cuatro ratas diabéticas y cuatro ratas control fueron sacrificadas y analizadas a las 16 semanas. Se realizaron extractos proteicos a partir de las retinas (control vs. diabéticas) y en ellos se analizó la expresión de A1AT con la técnica de *western blot* (WB). Para este ensayo se utilizó un anticuerpo primario anti-A1AT y como control anticuerpos anti-GAPDH. Además, cortes transversales de las retinas

remnantes se montaron en portaobjetos y analizarlos mediante inmunofluorescencia, utilizando el mismo anticuerpo anti-A1AT.

Resultado. En los ensayos de WB se identificó la expresión de la proteína A1AT en extractos proteicos de retina en los animales diabéticos y no diabéticos. No se observaron diferencias significativas en la expresión de la enzima entre los dos grupos de animales.

Conclusión. Nuestra investigación muestra por primera vez la presencia de la A1AT en la retina de animales diabéticos y no diabéticos. Estos resultados junto con la incorporación reciente de la A1AT en el tratamiento de la diabetes tipo 1 sugieren estudiar el rol de dicha proteína en procesos inflamatorios de la retina como es el caso de la retinopatía diabética.

Expression of alpha-1-antitrypsin (A1AT) in the retina of diabetic and non-diabetic rats

Introduction. Diabetic retinopathy (DR) is the most common cause of blindness in the working-age population. Inflammatory processes are important due to their potential to cause blindness. The classical tools available to the ophthalmologist to limit the inflammatory reaction are restricted to two types of drugs: non-steroid anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and corticosteroids. Both types of drugs are effective and pretty well tolerated in acute inflammatory processes. However, the problem arises when prolonged administration is required, with the consequent emergence of significant local and systemic undesirable effects. The aim of this paper is to evaluate the use of alpha-1-antitrypsin (A1AT) as an endogenous anti-inflammatory agent.

Objective. To identify the presence of A1AT, a serine protease inhibitor (*serpin*), in the retina of diabetic and non-diabetic rats.

Methods. On day 2 of life, newborn Wistar rats received an intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ). Rats that after 2 days of STZ induction had glucose levels over 200 mg/dl were classified as diabetic. Groups of four diabetic rats and of four control rats were sacrificed and evaluated at 16 weeks. Protein extracts were obtained from the retinas (control vs. diabetic) in which A1AT expression was analyzed by western blot (WB). For this assay we used a primary anti-A1AT antibody and anti-GAPDH antibodies as controls. In addition, cross-sections of the remnant retinas were placed on slides for analysis by immunofluorescence using the same anti-A1AT antibody.

Result. AIAT protein expression was identified by WB assays in retinal protein extracts from diabetic and non-diabetic rats. No significant differences were observed in the enzyme expression between both groups of rats.

Conclusion. Our investigation has been the first to evidence the presence of AIAT in the retina of diabetic and non-diabetic rats. These results, together with the recent incorporation of AIAT to the treatment of Type 1 diabetes suggest that the role of this protein in retinal inflammatory processes, such as in diabetic retinopathy, should be studied.

Expressão de alfa-1-antitripsina (AIAT) na retina de ratos diabéticos e não diabéticos

Introdução. A retinopatia diabética (RD) é a causa mais frequente de cegueira na população em idade ativa. Os processos inflamatórios são relevantes devido à possibilidade de causar cegueira. As ferramentas clássicas das que dispõe o oftalmologista para limitar a reação inflamatória estão circunscritas a dois tipos de drogas: os anti-inflamatórios não esteroides (AINES) e os corticoides. Ambas as drogas são eficazes e suficientemente bem toleradas em processos inflamatórios agudos. Porém, o problema aparece quando for preciso o uso prolongado, surgindo então efeitos não desejados relevantes tanto locais quanto sistêmicos. Neste trabalho desejamos avaliar a utilização de alfa-1-antitripsina (AIAT) como anti-inflamatório endógeno.

Propósito. Identificar a presença da alfa-1-antitripsina (AIAT), um inibidor de serino proteases (*serpin*), na retina dos ratos diabéticos e não diabéticos.

Métodos. No segundo dia de vida, os ratos Wistar neonatos receberam uma injeção intraperitoneal de estreptozotocina (STZ). Foram classificados como ratos diabéticos aqueles que após 2 dias a partir da indução com STZ tinham glicemia maior de 200mg/dL. Grupos de quatro ratos diabéticos e quatro ratos controle foram sacrificados e analisados após 16 semanas. Foram realizados extratos proteicos a partir das retinas (controle vs. diabéticos) e neles foi analisada a expressão de AIAT com a técnica de *western blot* (WB). Para esse ensaio foi utilizado um anticorpo primário anti-AIAT e como controle anticorpos anti-GAPDH. Além disso, cortes transversais das retinas remanescentes montaram-se em porta-objetos e foram analisados mediante imunofluorescência, utilizando o mesmo anticorpo anti-AIAT.

Resultado. Nos ensaios de WB foi identificada a expressão da proteína AIAT em extratos proteicos de

retina nos animais diabéticos e não diabéticos. Não foram observadas diferenças significativas na expressão da enzima entre os dois grupos de animais.

Conclusão. Nossa pesquisa mostra pela primeira vez a presença da AIAT na retina de animais diabéticos e não diabéticos. Esses resultados junto com a incorporação recente da AIAT no tratamento da diabetes tipo 1 sugerem estudar o papel dessa proteína em processos inflamatórios da retina como é o caso da retinopatia diabética.

La melatonina previene la retinopatía en un modelo experimental de *Diabetes mellitus* tipo 2 temprana

Miranda M, Salido EM, Bordonc M, Chianelli M, Keller Sarrovento MI, Dorfman D, Rosenstein RE

Laboratorio de Neuroquímica Rutinaria y Oftalmología Experimental, Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, UBA, CIByBO-COINCEIT, mappi.miranda@hotmail.com

Objetivos. La retinopatía diabética es la principal causa de ceguera adquirida en adultos, en su mayoría afectados por *Diabetes mellitus* tipo 2 (DM2). Hemos desarrollado un modelo experimental de DM2 en ratas adultas que reproduce características de la DM2 humana en sus etapas iniciales y provoca alteraciones retinales significativas. El objetivo de este trabajo fue analizar el efecto de la melatonina sobre los cambios retinales inducidos por la alteración metabólica moderada.

Métodos. Ratas *Wistar* macho adultas recibieron una dieta estándar o 30% de sacarosa en el agua de bebida *ad libitum*. Tres semanas después de este tratamiento, los animales fueron inyectados con vehículo o estreptozotocina (STZ, 25 mg/kg, i.p.). Dos días después de la inyección de vehículo o STZ se implantó un *pellet* subcutáneo de 20 mg de melatonina, que se reemplazó cada 15 días. Se examinó la glucemia en ayunas y posprandial y el test de tolerancia intraperitoneal a insulina y a una sobrecarga de glucosa, la función retinal (ERG), la peroxidación lipídica (fluorometría), la actividad de NOS (usando 3H-arginina) y los niveles de TNF α (ELISA).

Resultados. A las 12 semanas de tratamiento, los animales que recibieron una dieta rica en sacarosa y

STZ mostraron diferencias significativas en las pruebas metabólicas, en comparación con los grupos control. La melatonina, que no afectó el metabolismo glucídico en ratas control o diabéticas, redujo significativamente la disminución en la amplitud de las ondas a y b del ERG y de los potenciales oscilatorios, el aumento de la peroxidación lipídica, la actividad de la NOS, los niveles de TNF α , así como el aumento en los niveles de proteína ácida gliofibrilar en células de Müller y del factor de crecimiento vascular endotelial.

Conclusiones. Estos resultados indican que la melatonina protege a la retina de las alteraciones observadas en un modelo experimental de retinopatía diabética asociada con DM2.

Subsidios. ANPCyT, UBA, CONICET.

Melatonin prevents retinopathy in an experimental model of early type 2 Diabetes mellitus in rats

Objetivos. Diabetic retinopathy is the main cause of acquired blindness in adults, most of whom suffer from type 2 Diabetes mellitus (DM2). We have developed an experimental model of DM2 in adult rats that reproduces characteristics of human DM2 in its early stages and causes significant retinal disorders. The aim of this paper was to analyze the effect of melatonin on retinal changes induced by moderate metabolic alteration.

Methods. Adult male Wistar rats received a standard diet or 30% sucrose in drinking water *ad libitum*. After 3 weeks of this treatment, rats were injected vehicle or streptozotocin (STZ, 25 mg/kg, i.p.). Two days after injection of vehicle or STZ, a subcutaneous pellet of 20 mg of melatonin was implanted, and it was replaced at 15-day intervals. We evaluated: fasting and postprandial glucose levels, intraperitoneal insulin and glucose overload tolerance tests, retinal function (ERG), lipid peroxidation (fluorometry), NOS activity (using 3H-arginine) and TNF α (ELISA).

Results. Twelve weeks after treatment, rats that received a sucrose-rich diet and STZ evidenced significant differences in metabolic tests vs. control groups. Melatonin, which did not affect glucose metabolism in control or diabetic rats, significantly reduced ERG a- and b- wave amplitude and oscillatory potentials amplitude, the increase in lipid peroxidation, NOS activity, TNF α levels, as well as the increase in the levels of glial fibrillary acidic protein in Müller cells and vascular endothelial growth factor.

Conclusion. These results indicate that melatonin protects the retina from the alterations observed in an experimental model of diabetic retinopathy associated with DM2.

Supports. ANPCyT, UBA, CONICET.

A melatonina evita a retinopatia em um modelo experimental de Diabetes mellitus tipo 2 precoce

Objetivos. A retinopatia diabética é a principal causa de cegueira adquirida em adultos, maiormente afetados por *Diabetes mellitus* tipo 2 (DM2). Temos desenvolvido um modelo experimental de DM2 em ratos adultos que reproduz características da DM2 humana em suas fases iniciais e provoca alterações retinianas significativas. O objetivo deste trabalho foi analisar o efeito da melatonina sobre as alterações retinianas induzidas pela alteração metabólica moderada.

Métodos. Ratos Wistar macho adultos receberam uma dieta padrão ou 30% de sacarose na água bebida *ad libitum*. Três semanas depois deste tratamento, os animais foram injetados com veículo ou estreptozotocina (STZ, 25 mg/kg, i.p.). Dois dias depois da injeção de veículo ou STZ foi implantado um pellet subcutâneo de 20 mg de melatonina, que foi substituído a cada 15 dias. Examinou-se a glicemia em jejum e pós-prandial e o teste de tolerância intraperitoneal a insulina e a uma sobrecarga de glicose, a função retiniana (ERG), a peroxidação lipídica (fluorometria), a atividade de NOS (usando 3H-arginina) e os níveis de TNF α (ELISA).

Resultados. Após 12 semanas de tratamento, os animais que receberam uma dieta rica em sacarose e STZ mostraram diferenças significativas nos testes metabólicos, em comparação com os grupos controle. A melatonina, que não afetou o metabolismo glucídico em ratos controle ou diabéticos, reduziu significativamente a diminuição na amplitude das ondas a e b do ERG e dos potenciais oscilatórios, o aumento da peroxidação lipídica, a atividade da NOS, os níveis de TNF α , assim como o aumento nos níveis de proteína gliofibrilar ácida em células de Müller e do fator de crescimento vascular endotelial.

Conclusões. Esses resultados indicam que a melatonina protege a retina das alterações observadas num modelo experimental de retinopatia diabética associada com DM2.

Subsidios. ANPCyT, UBA, CONICET.

Protección de la retina frente al daño isquémico por acondicionamiento hipotérmico

Aranda M, Dorfman D, Bordone M, Chianelli M, Rosenstein BE, Salda EM

Laboratorio de Neurofisiología Retiniana y Oftalmología Experimental, Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, UBA, CEFyBO-CONICET.

maicos@ff77@bionmail.com

Objetivos. La isquemia es un componente central de diversas enfermedades retinales que pueden causar ceguera irreversible. Diversas evidencias indican que la excitotoxicidad por glutamato participa en el daño isquémico retinal. El objetivo de este trabajo fue examinar si un período breve de hipotermia global u ocular, aplicado 24 horas antes de la isquemia (precondicionamiento hipotérmico [PCH]) protege a la retina del daño inducido por isquemia/reperfusión y la participación del glutamato en la protección de la retina inducida por PCH.

Métodos. Se indujo isquemia retinal en ratas Wistar macho adultas por aumento de la presión intraocular a 120 mmHg durante 40 minutos. Un día antes de la isquemia, los animales fueron sometidos a hipotermia global (33°C por 20 min, aplicando bolsas de hielo al cuerpo del animal) u ocular (32°C por 20 min, a través del flujo de un gel a 13°C) y 14 días después de la isquemia se registraron electroretinogramas (ERG) escotópicos y se analizó la histología retinal.

Resultados. La isquemia provocó daños funcionales (ERG) e histológicos (espesor total de la retina y número de células ganglionares) significativos que fueron prevenidos por PCH global u ocular. Tres días después de la isquemia, el flujo de glutamato y la actividad de glutamina sintetasa retinales disminuyeron significativamente, en tanto que el PCH ocular previno significativamente el efecto de la isquemia sobre estos parámetros. La inyección intravítrea de niveles supra fisiológicos de glutamato reprodujo parcialmente las alteraciones electroretinográficas e histológicas provocadas por la isquemia, que fueron significativamente prevenidas por el PCH ocular.

Conclusiones. Estos resultados sugieren que el PCH global o local provee una protección funcional e histológica significativa frente al daño isquémico retinal a través de un mecanismo dependiente de glutamato.

Subsidios. ANPCyt, UBA, CONICET.

Retinal protection against ischemic damage by hypothermic preconditioning

Objectives. Ischemia is a core component of different retinal disorders that may cause irreversible blindness. There is plenty of evidence supporting that glutamate-induced excitotoxicity is involved in retinal ischemic damage. The goal of this paper was to examine whether a short period of global or ocular hypothermia, applied for 24 hours before ischemia (hypothermic preconditioning [HPC]) protects the retina from ischemia/reperfusion-induced damage, and the role of glutamate in HPC-induced retinal protection.

Methods. Retinal ischemia was induced in adult male Wistar rats by increasing intraocular pressure to 120 mmHg for 40 minutes. One day before ischemia, rats underwent global hypothermia (33°C for 20 min, by the application of ice packs to the rat's body) or ocular hypothermia (32°C for 20 min, via a gel flow at 13°C) and 14 days after ischemia induction, scotopic electroretinograms (ERG) were performed and retinal histology was analyzed.

Results. Ischemia caused significant functional (ERG) and histologic (total retinal thickness and number of ganglion cells) damages that were prevented by global or ocular HPC. Three days after ischemia induction, glutamate inflow and retinal glutamine synthetase activity had decreased significantly, while ocular HPC significantly prevented the effect of ischemia on these parameters. Intravitreal injection of supra physiological concentrations of glutamate partially mimicked the electroretinographic and histologic alterations produced by ischemia, which were significantly abrogated by ocular HPC.

Conclusions. These results suggest that global or local HPC provides significant functional and histologic protection against retinal ischemic damage via a glutamate-dependent mechanism.

Supports. ANPCyt, UBA, CONICET.

Proteção da retina contra dano isquêmico por pré-condicionamento hipotérmico

Objetivos. A isquemia é um componente central de diferentes doenças retinianas que podem causar cegueira irreversível. Diversas evidências indicam que a excitotoxicidade por glutamato participa no dano isquêmico retiniano. O objetivo deste trabalho foi examinar se um período breve de hipotermia global ou ocular, aplicado 24 horas antes da isquemia (precondicionamento hipotérmico [PCH]) protege a reti-

na do dano induzido por isquemia/reperfusão e a participação do glutamato na proteção da retina induzida por PCH.

Métodos. Foi induzida isquemia retiniana em ratos Wistar macho adultos por aumento da pressão intraocular a 120 mmHg durante 40 minutos. Um dia antes da isquemia, os animais foram submetidos à hipotermia global (33°C por 20 min, aplicando sacos de gelo no corpo do animal) ou ocular (32°C por 20 min, através do fluxo de um gel a 13°C) e 14 dias depois da isquemia registraram-se eletrorretinogramas (ERG) escotópicos e foi analisada a histologia da retina.

Resultados. A isquemia provocou danos funcionais (ERG) e histológicos (espessura total da retina e número de células ganglionares) significativos que foram prevenidos por PCH global ou ocular. Três dias depois da isquemia, o influxo de glutamato e a atividade de glutamato sintetase da retina diminuíram significativamente, enquanto o PCH ocular evitou significativamente o efeito da isquemia sobre esses parâmetros. A injeção intravítrea de níveis supra-fisiológicos de glutamato reproduziu parcialmente as alterações eletrorretinográficas e histológicas provocadas pela isquemia, que foram significativamente impedidas pelo PCH ocular.

Conclusões. Estes resultados sugerem que o PCH global ou local proporciona uma proteção funcional e histológica significativa contra o dano isquêmico da retina através de um mecanismo dependente de glutamato.

Subsídios. ANPCyT, UBA, CONICET.

Modelo de retinopatía inducida por oxígeno (OIR): caracterización y expresión de IGF-1R

Lotenc VE, Luna JD, Chlábrando GA, Sánchez MC

CHUCI-CONICET, Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, ylotenc@quimica.unc.edu.ar

Objetivo. Varias patologías oculares, incluyendo la retinopatía diabética proliferativa (RDP) y la retinopatía del prematuro (ROP), son el resultado de una neovascularización patológica. Diferentes modelos animales, como el de la retinopatía inducida por oxígeno (OIR), han sido desarrollados con el propósito de entender los mecanismos celulares y moleculares

que producen estas enfermedades. Uno de los factores de crecimiento involucrados tanto en el desarrollo fisiológico de la vasculatura retinal como en el patológico durante la ROP y RD es el factor de crecimiento similar-insulina (IGF-1). Por lo tanto resulta de gran interés poder elucidar el mecanismo de participación del sistema IGF-1/IGF-1R en patologías neovasculares retinales como las antes mencionadas, consideradas por su alta incidencia, de gran importancia en la población argentina.

Materiales y métodos. Utilizamos el método de OIR en ratones que, además de reproducir la ROP presenta algunas características de la RDP. Para ello, se colocaron ratones C57BL/6 en día postnatal 7 (P7) en una cámara con una concentración de oxígeno constante del 75% durante 5 días. Luego los animales fueron trasladados a la condición de oxígeno normal (21%) por otros 5 días más. Otro grupo de ratones de la misma edad se mantuvieron en oxígeno ambiental (21%) para ser empleados como control. Todos los animales se sacrificaron en p17. Se extrajeron los ojos de los ratones y se fijaron a 4% PFA, seguidos por un gradiente de sucrosa (10 y 30%) y se utilizaron tanto para la obtención de corticoides retinales así como para retinas completas (*flat mounts*). Con el objeto de identificar neovasos y localización del sistema IGF-1/IGF-1R se utilizaron diferentes anticuerpos y/o glicoproteínas conjugadas con fluorocromo o biotina. Las imágenes se obtuvieron de un microscopio confocal Olympus Fluoview FV1000.

Resultados. Por hematoxilina eosina observamos la presencia de ovalos neovasculares hacia la cavidad vítrea en retinas de ratón después del tratamiento de oxígeno, los cuales fueron confirmados mediante la utilización de la lectina *Griffonia simplicifolia* isolectin B4 (GSA). Dado que este modelo produce estrés a nivel de las células gliales de Müller (glions) debido a la hipoxia generada, también se observó la expresión de la proteína ácida fibrilar glial (GFPA). Finalmente cuando analizamos la expresión de IGF-1R a p17 en el modelo OIR, observamos un cambio en la distribución del receptor producido por una modificación en la estructura de la retina neural.

Conclusión. Los resultados demuestran que hemos podido reproducir en nuestro laboratorio el modelo de OIR y que luego del tratamiento con oxígeno los animales modificaron la expresión IGF1R en la retina neural.

Subsídios y agradecimientos. FONCYT, CONICET, SECYT-UNC.

Oxygen-induced retinopathy (OIR) model: characterization and expression of IGF-1R

Objetivos: Several ocular disorders, including proliferative diabetic retinopathy (PDR) and retinopathy of prematurity (ROP) are the consequence of pathologic neovascularization. Different animal models, such as that of oxygen-induced retinopathy (OIR), have been developed with the purpose of understanding the cellular and molecular mechanisms producing these diseases. One of the growth factors involved both in the physiologic and pathologic development of the retinal vasculature during ROP and DR is the insulin-like growth factor (IGF-1). Therefore, it is of great interest to elucidate the mechanism by which the IGF-1/IGF-1R is involved in the above mentioned neovascular retinal disorders that are considered to be of great significance in the Argentinian population due to their high incidence rates.

Material and methods: We used the OIR method in mice because, in addition to reproducing ROP it has some features of PDR. For such purpose, C57BL/6 mice were housed on day 7 post-birth (P7) in a chamber having a constant oxygen concentration of 75% during 5 days. After this, animals were relocated under normal oxygen conditions (21%) for 5 additional days. Another group of mice of the same age were housed under environmental oxygen conditions (21%) to serve as controls. All mice were euthanized on P17. Mice eyes were removed and fixed in 4% PFA, followed by a sucrose gradient (10 and 30%), and used both for collection of retinal corticosteroids and complete retinas (flat mounts). In order to identify neovessels and for localization of the IGF-1/IGF-1R system, different antibodies and/or conjugated glycoproteins with fluorochrome or biotin were used. Images were obtained from an Olympus Fluoview FV1000 confocal microscope.

Results: Hematoxylin-eosin staining revealed the presence of neovascular clusters towards the vitreous cavity in mice retinas after oxygen treatment, which were confirmed by using the lectin *Griffonia simplicifolia* (wlectin B4 (GS-IB4). Since this model produces stress at the level of the Müller glial cells (gliosis) due to the hypoxia generated, expression of the glial fibrillary acidic protein (GFAP) was also observed. Finally, upon analysis of IGF-1R expression on P17 in the OIR model, we observed a change in the distribution of the receptor caused by a modification in the structure of the neural retina.

Conclusion: The results evidence that we have been able to reproduce the OIR model in our laboratory and that after treatment with oxygen, mice modified IGF-1R expression in the neural retina.

Supports and acknowledgments: FONCYT, CONICET, SECYT-UNC.

Modelo de retinopatía induzida por oxígeno (OIR): caracterización e expressão do IGF-1R

Objetivos: Várias patologias oculares, incluindo a retinopatia diabética proliferativa (RDP) e a retinopatia do prematuro (ROP), são o resultado de uma neovascularização patológica. Diferentes modelos animais, como a retinopatia induzida por oxigênio (OIR), têm sido desenvolvidos com o propósito de entender os mecanismos celulares e moleculares que produzem essas doenças. Um dos fatores de crescimento envolvidos tanto no desenvolvimento fisiológico da vasculatura retiniana como no patológico durante a ROP e RD é o fator de crescimento insulina símile 1 (IGF-1). Portanto resulta muito interessante poder elucidar o mecanismo de participação do sistema IGF-1/IGF-1R em patologias neovasculares retinianas como as mencionadas anteriormente, consideradas pela alta incidência, de grande importância na população argentina.

Materiais e métodos: Utilizamos o método OIR em ratos que, além de reproduzir a ROP apresenta algumas características da RDP. Para isso, foram colocados ratos C57BL/6 no dia pós-natal sete (P7) numa câmara com uma concentração de oxigênio constante de 75% durante cinco dias. Depois, os animais foram levados à condição de oxigênio normal (21%) por mais cinco dias. Outro grupo de ratos da mesma idade foi mantido em oxigênio ambiental (21%) para ser usados como controle. Todos os animais foram sacrificados em p17. Foram removidos os olhos dos ratos e fixados em 4% PFA, seguidos por um gradiente de sacarose (10 e 30%) e utilizaram-se tanto para a obtenção de corticoides retinianos bem como para retinas completas (flat mounts). Com o intuito de identificar neovasos e localizar o sistema IGF-1/IGF-1R utilizaram-se diferentes anticorpos e/ou glicoproteínas conjugadas com fluoro cromo ou biotina. As imagens foram obtidas por microscópio confocal Olympus Fluoview FV1000.

Resultados: Por hematoxilina eosina observamos a presença de tufo neovasculares para a cavidade vítrea em retinas de rato depois do tratamento de oxigênio.

os quais foram confirmados mediante o uso da lectina *Griffonia simplicifolia* isolectin B4 (GSA). Dado que esse modelo produz estresse nas células gliais de Müller (gliose) devido à hipóxia gerada, também se observou a expressão da proteína ácida fibrilar glial (GFAP). Finalmente quando analisamos a expressão de IGF1R e p17 no modelo OIR, observamos uma alteração na distribuição do receptor produzido por uma modificação na estrutura da retina neural.

Conclusão. Os resultados demonstram que foi possível reproduzir no nosso laboratório o modelo de OIR e que após o tratamento com oxigênio, os animais modificaram a expressão IGF1R na retina neural.

Subsídios e agradecimentos. FONCYT, CONICET, SECYT-UNC.

Los receptores X de los retinoideos participan en la protección de los fotorreceptores frente al daño oxidativo

German OL, Múnaco S, Aguilazza D, Roitstein N, Pollán L

Instituto de Investigaciones Biotómicas de Bahía Blanca (INI-BIBB-CONICET), Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca objerman@cribs.edu.ar

Objetivo. En muchas enfermedades neurodegenerativas de la retina los fotorreceptores (FR) degeneran progresivamente por apoptosis causando ceguera. Los receptores nucleares X de los retinoideos (RXR) forman heterodímeros con miembros de diversas familias de receptores nucleares y podrían intervenir en la regulación de múltiples procesos de la retina. En nuestro laboratorio demostramos que un ligando natural de los RXR —el ácido docosahexaenoico (ADH)— promueve la supervivencia de los FR de retina de rata en modelos de neurodegeneración *in vitro*. Estudiamos aquí la participación de los RXR en la protección de los FR en modelos de neurodegeneración *in vitro*.

Métodos. Utilizando cultivos neuronales puros de retina de rata analizamos la presencia de los RXR en los FR, mediante inmunocitoquímica y Dot-blot. Investigamos su participación en la protección de los FR frente al daño oxidativo tratando a cultivo neuronales puros de retina con los agonistas HX630 o PA024 de RXR una hora antes de inducir daño

oxidativo con H₂O₂ (10 μ m). Por otra parte, en el día 3 tratamos a cultivos neuronales suplementados o no con ADH (6,7 μ m) con los antagonistas HX531 o PA452 a distintas concentraciones, previo al tratamiento con distintos oxidantes (paraquat, PQ 48 μ m o H₂O₂). Evaluamos la muerte neuronal con iodo de propidio y la apoptosis mediante el ensayo de TUNEL y la cuantificación de los FR con núcleos fragmentados o picnóticos con la sonda nuclear DAPI.

Resultados. Los FR en cultivo evidenciaron la expresión de los RXR. El tratamiento con agonistas del RXR protegió a los FR del daño oxidativo, disminuyendo el porcentaje de células muertas y FR apoptóticos en los cultivos neuronales sometidos a estrés oxidativo con H₂O₂. Por otra parte, antagonistas de los RXR inhibieron el efecto protector del ADH ante la apoptosis inducida con PQ y H₂O₂; mientras que el ADH disminuyó el número de FR TUNEL positivos y con núcleos fragmentados. En presencia de los antagonistas del RXR estos valores fueron semejantes a los de cultivos sometidos al daño oxidativo.

Conclusiones. Estos resultados implican que los RXR participarían en la protección de los FR en diferentes modelos de neurodegeneración *in vitro* y son la primera evidencia de que la activación de estos receptores es capaz de regular la supervivencia neuronal en la retina.

Subsídios y agradecimientos. ANCYF, CONICET y UNS.

Retinoid X orphan receptors are required to protect photoreceptors from oxidative stress

Objectives. In many retinal neurodegenerative diseases photoreceptors (PRs) progressively degenerate due to apoptosis, thus causing blindness. Nuclear retinoid X receptors (RXRs) form heterodimers with members of diverse nuclear receptor families and might have a role in the regulation of multiple retinal processes. In our laboratory, we have demonstrated that a natural RXR ligand —docosahexaenoic acid (DHA)— promotes retinal PR survival in rat models of neurodegeneration *in vitro*. Here we have evaluated the participation of RXRs in PR protection in neurodegeneration models *in vitro*.

Methods. The presence of RXRs in PRs was determined in pure retinal neuronal cultures by immunocytochemistry and Dot-blot. We investigated their role in the protection of PRs against oxidative damage by treating pure retinal neuronal cultures with the RXR agonists HX630 or PA024 one hour before inducing oxidative damage with H₂O₂ (10 μ m). On

the other hand, on day 3, neuronal cultures, supplemented or not with DHA (6,7 μ m) were treated with different oxidants (paraquat, PQ 48 μ m or H₂O₂). Neuronal death was evaluated with propidium iodide and apoptosis, with the TUNEL assay, while quantitation of PRs with fragmented or pyktonic nuclei was made with a DAPI nuclear probe.

Results. Cultured PRs evidenced RXR expression. Treatment with RXR agonists protected PRs from oxidative damage, thereby reducing the percentage of dead cells and apoptotic PRs in neuronal cultures that underwent oxidative stress with H₂O₂. Furthermore, RXR antagonists inhibited the protective effect of DHA against PQ and H₂O₂-induced apoptosis, while DHA reduced the number of TUNEL-positive PRs and of those with fragmented nuclei. In the presence of RXR antagonists, these values were similar to those of cultures under oxidative damage.

Conclusions. These results suggest that RXRs might have a role in the protection of PRs in different neurodegeneration models *in vitro* and they are the first evidence supporting that activation of these receptors can regulate neuronal survival in the retina.

Supports and acknowledgments. ANCYR, CONICET and UNS.

Os receptores X de retinoides participam na proteção dos fotorreceptores contra o dano oxidativo

Objetivo. Em muitas doenças neurodegenerativas da retina os fotorreceptores (FR) degeneram progressivamente por apoptose causando cegueira. Os receptores nucleares X dos retinoides (RXR) formam heterodímeros com membros de diversas famílias de receptores nucleares e poderiam intervir na regulação de múltiplos processos da retina. No nosso laboratório demonstramos que um ligando natural dos RXR —o ácido docosahexaenico (ADH)— promove a sobrevivência dos FR de retina de rato em modelos de neurodegeneração *in vitro*. Estudamos a participação dos RXR na proteção dos FR em modelos de neurodegeneração *in vitro*.

Métodos. Utilizando culturas neuronais puras de retina de rato analisamos a presença dos RXR nos FR, mediante imunocitoquímica e Dot-blot. Pesquisamos a sua participação na proteção dos FR contra o dano oxidativo tratando culturas neuronais puras de retina com os agonistas HX630 ou PA024 de

RXR uma hora antes de induzir dano oxidativo com H₂O₂ (10 μ m). Por outro lado, no dia 3 tratamos culturas neuronais suplementadas ou não com ADH (6,7 μ m) com os antagonistas HX531 ou PA452 em diferentes concentrações, previamente ao tratamento com distintos oxidantes (paraquat, PQ 48 μ m o H₂O₂). Avaliamos a morte neuronal com iodeto de propídio e a apoptose mediante o ensaio de TUNEL e a quantificação dos FR com núcleos fragmentados ou picnóticos com a sonda nuclear DAPI.

Resultados. Os FR em cultura evidenciaram a expressão dos RXR. O tratamento com agonistas do RXR protegeu os FR do dano oxidativo, diminuindo a porcentagem de células mortas e FR apoptóticos nas culturas neuronais submetidos a estresse oxidativo com H₂O₂. Por outro lado, antagonistas dos RXR inibiram o efeito protetor do ADH contra a apoptose induzida com PQ e H₂O₂; enquanto o ADH diminuiu o número de FR TUNEL positivos e com núcleos fragmentados. Em presença dos antagonistas do RXR, esses valores foram semelhantes às culturas submetidos ao dano oxidativo.

Conclusões. Esses resultados implicam que os RXR participariam na proteção dos FR em diferentes modelos de neurodegeneração *in vitro* e são a primeira evidência de que a ativação desses receptores pode regular a sobrevivência neuronal na retina.

Subsidios e agradecimientos. ANCYR, CONICET e UNS.

La exposición a un ambiente enriquecido protege a la retina del daño por glutamato

Dorfman D, Fernández DC, Rosenstein RE

Laboratorio de Neuroquímica Retiniana y Oftalmología Experimental, Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, CEE/BO-CONICET, dandorf@ffconicet.com

Objetivo. La excitotoxicidad inducida por aumento en los niveles de glutamato se ha asociado a diversas enfermedades que constituyen causas frecuentes de ceguera. Recientemente hemos demostrado que la exposición de ratas adultas a un ambiente enriquecido (AE) protege a la retina del daño isquémico. Considerando que el aumento en los niveles de glutamato juega un

rol central en el daño isquémico retinal, el objetivo de este trabajo fue analizar el efecto de la exposición a un AE frente al daño retinal inducido por glutamato.

Métodos. Se inyectó una solución de glutamato en la cámara vítrea de un ojo de ratas Wistar macho adultos y vehículo en el ojo contralateral. Luego los animales se albergaron en un ambiente estándar (AS) o AE por siete días. El AE consistió en jaulas grandes (100 x 50 x 82 cm) conteniendo varias tolvas de alimento, ruedas y objetos de distintas formas, texturas y colores que se reposicionaron una vez por día. Luego de 7 días de exposición a AE o AS se analizó la función (por electroretinografía, ERG), la histología y la reactividad glial (inmunomarcación de la proteína gliofibrilar ácida [GFAP]) retinales, así como el transporte anterógrado de la subunidad β de la toxina del cólera (CTB) desde la retina al colículo superior (CS).

Resultados. En animales expuestos a un AS, el glutamato indujo una caída significativa en la amplitud de las ondas a y b del ERG y en el número de células ganglionares retinales (CGR), aumento en la inmunomarcación para GFAP y disminución en la densidad de proyecciones retinales al CS. La exposición a AE revertió significativamente la disfunción retinal, la disminución en el número de CGR, el aumento en los niveles de GFAP y protegió el transporte activo entre la retina y el CS.

Conclusiones. Estos resultados sugieren que la exposición a un AE podría constituir una nueva estrategia terapéutica para el tratamiento del daño retinal inducido por excitotoxicidad glutamatérgica.

Subvenciones. ANPCYT, UBA, CONICET.

Enriched environment housing protects the retina against glutamate-induced injury

Objetivos. Excitotoxicity induced by an increase in glutamate levels has been associated with several diseases that are common causes of blindness. Recently, we have demonstrated that exposure of adult rats to an enriched environment (EE) protects the retina from ischemic injury. Based on the fact that increased glutamate levels have a core role in retinal ischemic injury, the goal of this paper was to analyze the effect of exposure to an EE against glutamate-induced retinal injury.

Method. A glutamate solution was injected into the vitreous chamber of one eye of adult male Wistar rats, while vehicle was injected into the fellow eye. Mice were subsequently housed in a standard environment (SE) or EE for seven days. The EE featured large cages (100 x 50 x 82 cm) containing several food

hoppers, wheels and objects of different shapes, textures and colors that were repositioned once daily. After 7 days of exposure to an EE and SE we analyzed retinal function (by electroretinography, ERG), histology and glial reactivity (immunomarking of the glial fibrillary acidic protein, GFAP), as well as anterograde transport of the cholera toxin β subunit (CTB) from the retina to the superior colliculus (SC).

Results. In animals exposed to a SE, glutamate induced a significant drop in ERG a- and b-wave amplitudes and in the number of retinal ganglion cells (RGCs), an increase in immunomarking for GFAP and a reduction in the density of retinal projections to the SC. Exposure to an EE significantly reversed retinal dysfunction, the reduction in the number of RGCs and the increase in GFAP levels; in addition, it protected active transport between the retina and the SC.

Conclusions. These results suggest that exposure to an EE might be a novel therapeutic strategy for the treatment of glutamatergic excitotoxicity.

Support. ANPCYT, UBA, CONICET

A exposição a um ambiente enriquecido protege a retina contra danos pelo glutamato

Objetivos. A excitotoxicidade induzida por aumento nos níveis de glutamato tem sido associada a diversas doenças que são causas frequentes de cegueira. Recentemente, temos demonstrado que a exposição de ratos adultos a um ambiente enriquecido (AE) protege a retina do dano isquêmico. Considerando que o aumento nos níveis de glutamato tem um papel central no dano isquêmico retiniano, o objetivo deste trabalho foi analisar o efeito da exposição a um AE contra o dano retiniano induzido por glutamato.

Métodos. Foi injetada uma solução de glutamato na câmara vítrea de um olho de rato Wistar macho adulto e veículo no olho contralateral. Depois, os animais foram acomodados em um ambiente padrão (AP) ou AE por sete dias. O AE consistiu em grandes gaiolas (100 x 50 x 82 cm) contendo várias tremontas de alimento, rodas e objetos de diferentes formas, texturas e cores que foram reposicionados uma vez por dia. Após sete dias de exposição a AE ou AP foi analisada a função (por eletroretinografia, ERG), a histologia e a reatividade glial (inmunomarcção da proteína gliofibrilar ácida [GFAP]) retiniana, assim como o transporte anterógrado da subunidade β da toxina do cólera (CTB) desde a retina até o colículo superior (CS).

Resultados. Em animais expostos a um AP, o glutamato induziu uma queda significativa na amplitude

das ondas *a* e *b* do ERG e no número de células ganglionares retinianas (CGR), aumento na imunomarcagem para GFAP e diminuição na densidade de projeções retinianas ao CS. A exposição ao AE reverteu significativamente a disfunção retiniana, a diminuição no número de CGR, o aumento nos níveis de GFAP e protegeu o transporte ativo entre a retina e o CS.

Conclusões: Esses resultados sugerem que a exposição a um AE poderia constituir uma nova estratégia terapêutica para o tratamento do dano retiniano induzido por excitotoxicidade glutamatérgica.

Subsídios: ANPCYT, UBA, CONICET.

Adaptación de equipo de adquisición de señales Biopac MP150 como electroretinógrafo estándar

Quintero ML, Benedetto M, Vera de Payet E, Corina MA

Laboratorio de Procedimientos de Señales, BCFPYN, Universidad Nacional de Córdoba

CIQUIBIC (CONICET), Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba

mlaz@qquibic.com

Introducción: Las electroretinografías (ERG) son registros de biopotenciales retinales que permiten conocer el estado funcional de la retina y sus componentes celulares. Estas señales tienen dos parámetros importantes: 1) la amplitud de la señal, la cual puede variar desde "cero" a unos pocos cientos de microvolts (μV) y 2) tiempos de latencia que corresponde al tiempo en el cual las células fotorreceptoras emiten respuesta frente a estímulos lumínicos medidos en el orden de milisegundos (ms). En estados patológicos ambos parámetros se ven afectados. Para que las señales puedan ser estudiadas deben ser acondicionadas, aumentando sus niveles de amplitud antes y después de la etapa de filtrado, el cual es necesario para reducir el ruido que se introduce en el proceso de adquisición de la señal. Debido a que la amplitud del biopotencial retinal disminuye notablemente con la enfermedad, se hace imprescindible que el acondicionamiento de la señal se realice en forma correcta cuidando de no perder información relevante.

Los cambios en los parámetros pueden estudiarse en modelos animales con degeneraciones retinales.

Objetivo: Adquirir y pre-acondicionar señales de ERG con un equipo comercial de adquisición de señales Biopac MP150 y software AcqKnowledge 4.1 para verificar si éste puede ser utilizado como electroretinógrafo en estudios de degeneración retinal en ratas Wistar bajo protocolos internacionales.

Métodos: Las señales se adquirieron en ratas albinas Wistar con funciones retinales normales. Los animales se sometieron a anestesia con 200 $\mu\text{l}/100\text{g}$ de peso corporal de quetamina-xilacina (3 partes de quetamina por 1 de xilacina); la dilatación pupilar se logró con colirio de tropicamida y se utilizó un ungüento anestésico tópico. El equipo cuenta con un sistema de pre-amplificación y filtrado diseñado para trabajar con señales de electroretinografías con ganancias de amplificación de hasta 10.000 veces y filtro pasabanda de 0.3 a 300 hz. Se diseñó un fotoestimulador a base de LEDs de alta potencia, 12V-1A sincronizado con el Biopac.

Resultados: Los resultados muestran que con el equipo utilizado se cubrieron las especificaciones de protocolos internacionales, en particular de la ISCEV.

Conclusiones: Podemos concluir que el Biopac MP150, con las adaptaciones del fotoestimulador y el pre-amplificador realizadas, es un equipo óptimo para registrar ERG.

Adaptation of the Biopac MP150 signal acquisition system as a standard electroretinography system

Introduction: Electroretinographies (ERGs) are records of retinal biopotentials by which the functional status of the retina and its cellular components can be known. These signals have two important parameters: 1) signal amplitude, which can range from zero to a few microvolts (μV), and 2) latency times, i.e. the time during which photoreceptor cells respond to light stimuli, measured on the order of milliseconds (ms). In pathologic states both parameters are affected. For signals to be studied they have to be conditioned by increasing their amplitude levels before and after the filtering stage, which is necessary to reduce the noise introduced in the process of signal acquisition. Since the retinal biopotential amplitude decreases markedly with the disease, signal conditioning must be performed correctly so as not to miss relevant information.

Changes in parameters can be studied in animal models with retinal degenerations.

Objective: To acquire and precondition ERG sig-

nals with a commercial signal acquisition device, Biopac MP150, and AcqKnowledge 4.1 software in order to verify if it can be used as an electroretinograph in retinal degeneration studies in Wistar rats according to international protocols.

Methods. Signals were acquired from Wistar albino rats with normal retinal functions. Rats were anesthetized with 200 μ l/100 g of body weight of ketamine-xylazine (3 parts ketamine + 1 part xylazine); pupillary dilation was induced with tropicamide eyedrops and topical anesthetic ointment was used. The device features a pre-amplification and filtering system designed to work with electroretinographic signals with amplification gains of up to 10,000 times and a bandpass filter of 0.3 to 300 Hz. A photostimulator was designed based on high-potency LEDs, 12V-1A, synchronized with the Biopac.

Results. The results evidence that the system used covered the specifications of international protocols, particularly of the ISCEV.

Conclusions. It might be concluded that the Biopac MP150, with its photostimulator and pre-amplifier adapted as described above, is an optimal system for ERG.

Adaptação do equipamento de aquisição de sinais Biopac MP150 como eletroretinógrafo padrão

Introdução. As eletroretinografias (ERG) são registros de biopotenciais retinianos que permitem conhecer o estado funcional da retina e seus componentes celulares. Esses sinais têm dois parâmetros importantes: 1) a amplitude do sinal, que pode variar desde "zero" até algumas centenas de microvolts (μ V) e 2) tempos de latência, que corresponde ao tempo no qual as células fotorreceptoras emitem resposta a estímulos luminosos, mediados na ordem de milissegundos (ms). Em estados patológicos ambos os parâmetros são afetados. Para que seja possível estudar os sinais será preciso ajustá-los, aumentando seus níveis de amplitude antes e depois da fase de filtragem necessária para reduzir o ruído introduzido no processo de aquisição do sinal. Devido a que a amplitude do biopotencial da retina diminui notavelmente com a doença, resulta imprescindível que o ajuste do sinal seja realizado corretamente cuidando de não perder informação relevante.

As mudanças nos parâmetros podem ser estudadas em modelos animais com degenerações retinianas.

Objetivo. Adquirir e ajustar previamente os sinais

de ERG com um equipamento comercial de aquisição de sinais Biopac MP150 e *software* AcqKnowledge 4.1 para verificar se ele pode ser utilizado como eletroretinógrafo em estudos de degeneração retiniana em ratos Wistar sob protocolos internacionais.

Métodos. Os sinais foram adquiridos em ratos albinos Wistar com funções retinianas normais. Os animais foram submetidos a anestesia com 200 μ l/100g de peso corporal de quetamina-xilazina (3 partes de quetamina por 1 de xilazina); a dilatação pupilar foi obtida com colírio de tropicamida e foi utilizado um unguento anestésico tópico. O equipamento tem um sistema de pré-amplificação e filtragem projetado para trabalhar com sinais de eletroretinografias com ganhos de amplificação de até 10.000 vezes e filtro passa-faixa de 0.3 a 300 Hz. Projeta-se um foto-estimulador baseado em LEDs de alta potência, 12V-1A sincronizado com o Biopac.

Resultados. Os resultados mostram que com o equipamento utilizado foram cobertas as especificações de protocolos internacionais, em particular da ISCEV.

Conclusões. Podemos concluir que o Biopac MP150, com as adaptações do foto-estimulador e do pré-amplificador realizadas, é um equipamento ótimo para registrar ERG.

Interacción entre las células gliales de Müller y las neuronas fotorreceptoras en ratones portadores de una degeneración retinal

Volomé YA, Simón MV, Germán OL, Rotstein NP, Palití LE

Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca (INIBIOPROCONICET), Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, volome@cribio.edu.ar

Objetivo. Las enfermedades neurodegenerativas de la retina, como la retinitis pigmentosa, se caracterizan por la pérdida progresiva e irreversible de neuronas fotorreceptoras. Para investigar las causas y los posibles tratamientos para esta enfermedad resulta útil contar con un modelo animal donde los fotorreceptores (FR) sean afectados por un proceso degenerativo similar al que ocurre en esta enfermedad, como los ratones "rd". Estudios previos de varios laborato-

rios incluyendo el nuestro, demuestran el rol de las células gliales de Müller (CGM) en la supervivencia y desarrollo de los FR. Recientemente establecimos que las CGM inducen la transformación de células progenitoras de retina en células madre multipotentes, las cuales luego pueden diferenciarse como FR, sugiriendo que las CGM podrían contribuir a regenerar los FR en los procesos degenerativos de la retina. Si bien se han estudiado intensivamente las causas de la retinitis pigmentosa, el rol de las células gliales y sus posibles alteraciones en esta patología están aún inexplorados. Investigamos ahora el desarrollo de las CGM de ratones "rd" y sus interacciones con los FR de retina.

Métodos. Utilizamos cultivos mixtos neurogliales obtenidos de retinas de ratones "rd" de dos días. Los cultivos se fijaron a distintos tiempos de desarrollo y analizados para determinar la muerte de los FR, utilizando la sonda nuclear DAPI y la progresión en ciclo celular, midiendo la incorporación de Br deoxi-uridina (BrdU) y la expresión del filamento intermedio nestin como marcador de células madre multipotentes.

Resultados. Las CGM proliferan activamente incorporando BrdU en forma aparentemente normal. Sin embargo, mientras en CGM de retina de rata la expresión de nestin se mantiene homogénea durante tiempos prolongados en cultivo, en CGM de retinas rd dicha expresión no fue homogénea y en muchos casos perdió su patrón filamentoso. El cocultivo con CGM no logró evitar la apoptosis neuronal: el porcentaje de FR "rd" apoptóticos aumentó progresivamente desde un 5% a un 50% entre los días 8 y 16, en forma similar a lo que ocurre en la retina *in vivo*.

Conclusiones. Nuestros resultados preliminares sugieren que además de los defectos ya demostrados para los FR en ratones "rd", las CGM podrían presentar alteraciones que influirían en la muerte de FRs.

Subsidios. FONCYT, CONICET Y UNS.

Interaction between Müller glial cells and photoreceptor neurons in mice with a retinal degeneration

Objectives. Retinal neurodegenerative diseases, such as retinitis pigmentosa, are characterized by progressive and irreversible loss of photoreceptor neurons. For the investigation of the causes and possible treatments for this disease, an animal model, such as "rd" mice, in which photoreceptors (PRs) are affected by a degenerative process similar to the one occurring in this disease, is useful. Previous studies from several laboratories, including ours, demonstrate the role of

Müller glial cells (MGCs) in PR survival and development. We have recently established that MGCs induce the transformation of retinal progenitor cells into multipotent stem cells, which can subsequently differentiate as PRs, thus suggesting that MGCs might contribute to PR regeneration in retinal degenerative processes. Though the causes of retinitis pigmentosa have been investigated extensively, the role of glial cells and their possible alterations in this disease still remain to be elucidated. We have investigated the development of MGCs of "rd" mice and their interactions with retinal PRs.

Methods. We have used mixed neuroglial cultures obtained from retinas of 2-day "rd" mice. Cultures were fixed at different development time-points and analyzed to determine PR death, using the DAPI nuclear probe whereas progression of the cellular cycle was evaluated by measuring the incorporation of Br-deoxy-uridine (BrdU) and the expression of the intermediate filament nestin as a marker of multipotent stem cells.

Results. MGCs proliferate actively with apparently normal BrdU incorporation. However, while in rat retinal MGC nestin expression remains homogeneous for long times in culture, in retinal MGCs from rd mice this expression was not homogeneous and, in many cases, the filamentous pattern was lost. Co-culture with MGCs failed to prevent neuronal apoptosis: the percentage of apoptotic "rd" PRs increased progressively from 5% to 50% between days 8 and 16, similarly to what has been observed in retinas *in vivo*.

Conclusions. Our preliminary results suggest that, in addition to the defects already demonstrated for PRs in "rd" mice, MGCs might have alterations influencing PR death.

Supports. FONCYT, CONICET and UNS.

Interação entre as células gliais de Müller e os neurónios fotorreceptores em ratos portadores de degeneração retiniana

Objetivos. As doenças neurodegenerativas da retina como a retinite pigmentosa, caracterizam-se pela perda progressiva e irreversível de neurónios fotorreceptores. Para pesquisar as causas e possíveis tratamentos para essas doenças é útil ter um modelo animal em que os fotorreceptores (FR) sejam afetados por um processo degenerativo semelhante ao que ocorre nesta doença, como os ratos "rd". Estudos prévios de vários laboratórios incluindo o nosso, demonstram o papel das células gliais de Müller (CGM) na sobrevivência e desenvolvimento dos FR. Recientemente estabelece-

mos que as CGM induzem a transformação de células progenitoras de retina em células-tronco multipotentes, as quais podem se diferenciar depois como FR, sugerindo que as CGM poderiam contribuir na regeneração dos FR nos processos degenerativos da retina. Embora tenham sido estudadas intensivamente as causas da retinite pigmentosa: o papel das células gliais e suas possíveis alterações nesta patologia estão ainda inexploradas. Pesquisamos agora o desenvolvimento das CGM de ratos "rd" e suas interações com os FR de retina.

Métodos. Utilizamos culturas mistas neurogliais obtidas de retinas de ratos "rd" de dois dias. As culturas foram fixadas em diferentes tempos de desenvolvimento e analisadas para determinar a morte dos FR, utilizando a sonda nuclear DAPI e a progressão em ciclo celular: medindo a adição de ^3H desoxiuridina (BrdU) e a expressão do filamento intermediário nestina como marcador de células-tronco multipotentes.

Resultados. As CGM proliferam ativamente incorporando BrdU em forma aparentemente normal. No entanto, enquanto em CFM da retina de rato a expressão de nestina permanece homogênea durante tempos prolongados em cultura, em CGM de retinas rd, essa expressão não foi homogênea e em muitos casos perdeu seu padrão filamentosos. A co-cultura com CGM não evitou apoptose neuronal: a porcentagem de FR "rd" apoptóticos aumentou progressivamente desde 5% até 50% entre os dias 8 e 16, em forma semelhante ao ocorrido na retina *in vivo*.

Conclusões. Nossos resultados preliminares sugerem que, além dos defeitos já demonstrados para os FR em ratos "rd", as CGM poderiam apresentar alterações que influiriam na morte de FRs.

Subsidios. FONCYT, CONICET e UNS.

El receptor endotelinérgico de tipo A (ETA) estaría involucrado en la transmisión intrarretinal de los estímulos visuales

Bermúdez V, Suburo AM

Facultad de Ciencias Biomédicas, Universidad Austral, Pilar (Buenos Aires).

vbermude@ccs.austral.edu.ar

Objetivo. Proviamente demostramos la presencia de ETA en el terminal sináptico de los fotorreceptores (FR). Asimismo, el bloqueo de ETA mediante clazosentan aumenta la pérdida de FR en los anima-

les expuestos a niveles tóxicos de luz. Investigamos el posible papel de ETA en la transmisión de estímulos visuales mediante: a) detección de marcadores de los terminales sinápticos después de exposición breve a estímulos fototóxicos en presencia o ausencia de clazosentan, y b) activación de c-Fos después de exposición a estímulos luminosos fisiológicos en presencia o ausencia de clazosentan.

Metodología. Se emplearon ratones Balb-c (machos, 5-7 semanas). Los niveles fototóxicos fueron 1500 lux por 2 días. Los estímulos no fototóxicos fueron de 0.3 lux \pm 2 Hz durante 60 minutos. Se estudiaron grupos controles y sometidos a iluminación, con o sin clazosentan (10 mg/kg/día). Después de la exposición, los animales fueron sacrificados y sus ojos procesados para la detección inmunohistoquímica de la proteína sináptica PSD95 y c-Fos (n=3).

Resultados. Clazosentan aumentó la PSD95-IR y apareció en la CPE de animales sometidos a iluminación estándar. También aumentó PSD95-IR en los animales expuestos a iluminación fototóxica, tanto en ausencia como en presencia de clazosentan. En los animales controles mantenidos en oscuridad prácticamente no se encontraron núcleos retinales marcados con c-Fos. La exposición a iluminación estroboscópica indujo la aparición de c-Fos en la capa nuclear interna (CNI) y, en menor número, en la capa ganglionar (CG). El número de núcleos activados aumentó significativamente en las retinas estimuladas después de la administración de clazosentan.

Conclusiones. El aumento de PSD95-IR observado después de clazosentan o estimulación fototóxica sugiere cambios en las estructuras presinápticas de los FR. Estas modificaciones podrían asociarse con la modulación de la transmisión sináptica en la retina externa. Para verificar esta hipótesis se realizaron experimentos de activación de c-Fos en retinas con iluminación no fototóxica. El número de núcleos c-Fos⁺ en la retina interna, que constituye una medida de la activación de la CPE, fue mayor en los animales tratados con clazosentan que en los controles. Postulamos entonces que los receptores ETA de los fotorreceptores podrían modular la transmisión de impulsos entre la retina externa y la retina interna.

Subsidios. PICTO-Austral, 2008-00090.

The endothelin receptor A (ETA) might be involved in intraretinal transmission of visual stimuli

Objective. We have previously established the presence of ETA in the synaptic terminal of photoreceptors (PR). Furthermore, ETA blockade by means

of clazosentan increases photoreceptor loss in animals exposed to toxic light levels. We have investigated the possible role of ETA in the transmission of visual stimuli by means of: a) detection of synaptic terminal markers after brief exposure to phototoxic stimuli in the presence or absence of clazosentan, and b) c-Fos activation after exposure to physiologic light stimuli in the presence or absence of clazosentan.

Methodology. Balb-c mice (5-7-week males) were used. Phototoxic levels were 1500 lux for 2 days. Non-phototoxic stimuli were 0.3 lux at 2 Hz for 60 minutes. We also evaluated control groups subjected to light with or without clazosentan (10 mg/kg/day). After exposure, animals were euthanized and their eyes were processed for immunohistochemical detection of the synaptic protein PSD95 and c-Fos ($n=3$).

Results. Clazosentan increases PSD95-IR and appeared in the CPE of animals that underwent standard illumination. It also increased PSDS-IR in those exposed to phototoxic illumination, both in the absence and in the presence of clazosentan. In control animals kept in the dark almost no c-Fos-marked retinal nuclei were found. Exposure to stroboscopic illumination induced the appearance of c-Fos in the inner nuclear layer (INL) and, to a lesser extent, in the ganglion layer (GL). The number of activated nuclei increased significantly in the retinas stimulated after clazosentan administration.

Conclusions. PSD95-IR increase observed after clazosentan administration or phototoxic stimulation suggests changes in the presynaptic structure of PRs. These changes might be associated with modulation of synaptic transmission in the outer retina. C-Fos activation experiments were performed in retinas with or without phototoxic illumination in order to validate this hypothesis. The number of c-Fos(+) nuclei in the inner retina, the measure of CPE activation, was higher in animals treated with clazosentan than in controls. We therefore postulate that ETA receptors of photoreceptors might modulate impulse transmission between the outer and inner retina.

Support: PICTO-Austral, 2008-00090

O receptor endotelinérgico de tipo A (ETA) estaria envolvido na transmissão intra-retiniana dos estímulos visuais

Objetivo. Previamente temos demonstrado a presença de ETA no terminal sináptico dos fotorreceptores (FR). Também que o bloqueio de ETA mediante clazosentan aumenta a perda de FR nos animais expostos

a níveis tóxicos de luz. Pesquisamos o possível papel de ETA na transmissão de estímulos visuais mediante: a) detecção de marcadores dos terminais sinápticos depois de exposição breve a estímulos fototóxicos em presença ou ausência de clazosentan, e b) ativação de c-Fos depois de exposição a estímulos luminosos fisiológicos em presença ou ausência de clazosentan.

Metodologia. Foram usados ratos Balb-c (machos, 5-7 semanas). Os níveis fototóxicos foram 1500 lux por dois dias. Os estímulos não fototóxicos foram de 0,3 lux a 2 Hz durante 60 minutos. Foram estudados grupos controle e submetidos a iluminação, com ou sem clazosentan (10 mg/kg/dia). Depois da exposição, os animais foram sacrificados e seus olhos processados para a detecção imunohistoquímica da proteína sináptica PSD95 e c-Fos ($n=3$).

Resultado. Clazosentan aumentou a PSD95-IR e apareceu na CPE de animais submetidos a iluminação padrão. Também aumentou PSDS-IR nos animais expostos a iluminação fototóxica, tanto em ausência como em presença de clazosentan. Nos animais controle mantidos na escuridão quase não foram achados núcleos retiniais marcados com c-Fos. A exposição à iluminação estroboscópica induziu aparecimento de c-Fos na camada nuclear interna (CNI) e, em menor número, na camada ganglionar (CG). O número de núcleos ativados aumentou significativamente nas retinas estimuladas depois da administração de clazosentan.

Conclusões. O aumento de PSD95-IR observado depois de clazosentan ou estimulação fototóxica sugere alterações nas estruturas pré-sinápticas dos FR. Essas alterações poderiam associar-se com a modulação da transmissão sináptica na retina externa. Para verificar essa hipótese foram realizados testes de ativação de c-Fos em retinas com iluminação não fototóxica. O número de núcleos c-Fos+ na retina interna, que constitui uma medida da ativação da CPE, foi maior nos animais tratados com clazosentan que nos controles. Postulamos então que os receptores ETA dos fotorreceptores poderiam modular a transmissão de impulsos entre a retina externa e a retina interna.

Subídios: PICTO-Austral, 2008-00090

Instrucciones para los autores

La revista *Oftalmología Clínica y Experimental* acepta trabajos originales de investigación clínica, procedimientos quirúrgicos e investigación básica; informes de series de casos, informes de casos, comunicaciones breves, cartas de lectores, trabajos de revisiones sistemáticas y casos en formato de zóneas. Los trabajos originales pueden ser enviados en español, inglés o portugués.

El Comité Editorial de la revista adhiere a los principios establecidos por el International Committee of Medical Journal

Editors, se ajusta a los principios de la Declaración de Helsinki y a los principios de cuidado de animales para experimentación de la Association for Research in Vision and Ophthalmology.

Los manuscritos y las imágenes deben ser enviados por correo electrónico a la siguiente dirección: secretaria@oftalmologos.org.ar

Cada manuscrito debe ser acompañado por una carta indicando la originalidad del trabajo enviado, con la firma de conformidad de todos los autores para que el trabajo sea publicado y puesto en el sitio web. En casos de más de 5 (cinco) autores para trabajos

originales y 3 (tres) autores para los demás tipos de trabajo, se debe justificar por escrito la participación de los autores y la tarea que realizó cada uno.

Los trabajos que incluyan sujetos experimentales deben mencionar haber leído y estar de acuerdo con los principios establecidos en las declaraciones para el uso de individuos y animales en proyectos experimentales.

Los trabajos con intervención en pacientes o con información epidemiológica de individuos deben tener una carta de aprobación por el Comité de Ética de la institución donde se realizó el trabajo.

Instrucciones generales

Todos los trabajos deben ser escritos con el programa Word (Microsoft Office) en páginas tipo carta 21,6 x 26,9 cm dejando 2,5 cm de espacio en los cuatro márgenes y utilizando la familia tipográfica Times New Roman, tamaño de cuerpo 12, en formato "normal" (sin negrita ni cursiva) y con renglones a doble espacio. Cada página debe ser numerada consecutivamente desde la primera hasta la última con un título abreviado del trabajo y números correlativos automáticos. Aunque la extensión de los trabajos originales tiene un límite variable en general no debe superar las 6.000 palabras.

El formato básico incluye:

a) Página inicial: título en español y en inglés, autores y filiación académica, dirección y email del autor responsable; palabras clave

en español y en inglés. Se debe incluir toda institución o industria que haya financiado el trabajo en parte o en su totalidad.

b) Resumen en español que no ocupe más de una página o 250 palabras y deberá ser estructurado, es decir que tiene que incluir los subtítulos: Propósito/Objetivo, Métodos, Resultados y Conclusiones.

c) Abstract (inglés) de la misma extensión al resumen y estructurado también según estos ítem: Purpose, Methods, Results y Conclusions. No se aceptarán traducciones automáticas con procesadores de texto.

d) Cuerpo del trabajo dividido en: **Introducción, Material y métodos*, Resultados y Discusión.**

e) Las referencias bibliográficas de acuerdo con formatos de las publicaciones médicas. Numeradas en forma consecutiva según orden de mención en el texto.

*Las revistas de publicación científica comparativa deben seguir las directrices de los comités clínicos (<http://www.fda.gov/oc/ohrt/>) y de procedimientos (<http://www.fda.gov/oc/ohrt/>) (última consulta: 10 de octubre de 2010).
 *Todos los manuscritos con artículos científicos deben contener los procedimientos utilizados en la carta de presentación (debe incluir el número de artículo). Las discusiones deben ser breves y concisas, y utilizando las siglas para abreviar los términos que aparecen en el título y en el resumen. La puntuación y los signos de puntuación deben ser los mismos que los utilizados en el texto principal. Las unidades de medida deben seguirse al sistema internacional de unidades (SI). Para las abreviaturas de las unidades el siguiente enlace es el sitio: <http://www.bipm.org/units/>

Ejemplos:

• **Artículos en revistas:**

Halpern SD, Ubel PA, Caplan AL. Solidorgan transplantation in HIV-infected patients. *N Engl J Med* 2002; 347:284-7

• **Libro:**

Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA. *Medical microbiology*, 4th ed. St. Louis: Mosby, 2002.

• **Texto electrónico en CD:**

Anderson SC, Poulos KB. *Anderson's electronic atlas of hematology* [CD-ROM]. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2002.

• **Sitios web en internet:**

Cancer-Pain.org [sitio en internet]. New York: Association of Cancer Online Resources, Inc.; c2000-01 [actualizado 2002 May 16; citado 2002 Jul 9]. Disponible en: <http://www.cancer-pain.org/> (consultado el 20 ene. 2010)

f) Tabla/s escrita/s en Word con espacios entre columnas realizados con el tabulador. Cada tabla debe tener un título breve. No copiar tablas de Excel o Power Point. Cada tabla debe ser numerada en forma consecutiva según mención en el texto. Incluir las tablas al final del manuscrito no entre los párrafos del texto.

g) Leyendas de las ilustraciones (figuras y gráficos). Numerada en forma consecutiva según mención en el texto.

Ilustraciones

Figuras. Deben ser en blanco y negro (escala de grises de alto contraste). La resolución de captura inicial de las imágenes no debe ser menor de 300 dpi y el tamaño mínimo es de 10 cm de ancho. Se enviarán en formato TIFF o JPG sin comprimir. En caso de haber sido retocadas con Photoshop debe ser aclarado en que consistió la modificación en la carta que acompaña el envío del manuscrito. Las figuras en color tienen un costo adicional a cargo

de los autor/es. Las figuras combinadas deben realizarse en Photoshop. Las letras o textos dentro de las figuras tienen que tener un tamaño tal que al reducir la imagen a 10 cm de ancho las letras no sean más chicas que 3 mm de alto. Usar letras de trazos llenos. No usar figuras extraídas de presentaciones en Power Point. Ninguna figura debe contener información del paciente ni poder reconocer el paciente a través de la imagen excepto que éste dé su consentimiento por escrito para hacerlo.

Importante: Todas las imágenes deben ser originales y no pueden ser obtenidas de ningún medio digital que no sea del propio autor. En caso de imágenes cedidas por otro autor esto debe estar claramente mencionado entre parentesis en la leyenda de la figura.

Gráficos. Los gráficos deben ser realizados en programas destinados a ese fin y guardados en forma TIFF o JPG con resolución inicial de 1200 dpi. No se deben enviar gráficos realizados en Excel o Power Point. Los gráficos serán impresos en blanco y negro aconsejándose el uso de tramas claramente definidas para distintas superficies.

Instrucciones particulares para los distintos formatos

Trabajos originales. Pueden ser de investigación clínica aplicada, técnicas quirúrgicas, procedimientos diagnósticos y de investigación oftalmológica experimental básica. Se seguirán los lineamientos mencionados previamente en términos generales.

Comunicaciones breves. Serán hallazgos diagnósticos, observaciones epidemiológicas, resultados terapéuticos o efectos adversos, maniobras quirúrgicas y otros eventos que por su importancia en el manejo diario de la práctica oftalmológica requieren de una comunicación rápida hacia los médicos oftalmólogos.

Series y casos. Se estructurarán en: Introducción, Informe de caso, Comentarios. El resumen consistirá de una breve descripción no estructurada que incluya el porqué de la presentación, la información más destacada de lo observado y una conclusión. El texto tendrá una extensión máxima de 1000 pala-

bras incluyendo no más de 5 a 7 referencias bibliográficas y hasta 4 fotografías representativas.

Cartas de lectores. Serán dirigidas al editor y su texto no podrá exceder las 500 palabras. Pueden tratar sobre dichos y publicaciones en la misma revista o comentarios sobre otras publicaciones o comunicaciones en eventos científicos médicos.

Revisión sistemática. Deben actualizar un tema de interés renovado y debe realizarse basadas en una precisa revisión, lectura y análisis de la bibliografía. Debe incluir un índice de los subtemas desarrollados, las bases de datos bibliográficas utilizadas (tradicionales y no tradicionales) y una descripción de cómo se realizó la búsqueda y criterios de selección de las publicaciones.

Caso en forma de atenas. Los manuscritos debe incluir: 1) página inicial (igual que en los demás trabajos), 2) presentación del caso con la información necesaria para realizar un diagnóstico presuntivo, 3) discusión incluyendo diagnósticos diferenciales y procedimientos que pueden colaborar en la realización del diagnóstico, 4) resultados de los procedimientos diagnósticos, 5) diagnóstico, 6) seguimiento, 7) comentarios y 8) bibliografía. En lugar de resumen final del manuscrito se realizará una síntesis sumaria del caso presentado.

Imágenes en oftalmología. Se recibirán una o dos figuras que ilustren en forma excepcio-

nalmente clara una enfermedad, evolución o resolución quirúrgica. Las imágenes seguirán las normas requeridas para ilustraciones. El texto —excluyendo el título, autores y bibliografía— no deberá exceder las 250 palabras. Se podrán incluir no más de 3 referencias bibliográficas.

Información suplementaria

International Committee of Medical Journal Editors. *Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals: writing and editing for biomedical publication.* Se obtiene de <http://www.icmje.org>. [actualizado a abril 2010, consultado el: 19 de noviembre de 2010].

Nota: El objetivo del Comité editorial es alcanzar un nivel de excelencia en los trabajos aceptados para su publicación con el fin acceder a bases de datos de información médica internacionales. Tanto el Comité editorial como las autoridades del Consejo Argentino de Oftalmología son conscientes de las dificultades que tiene un oftalmólogo de atención primaria para la realización de trabajos, es por eso que a través de la secretaría de la revista se apoyará con los medios técnicos adecuados a aquellos autores que lo soliciten.

Si necesita más información comuníquese con el teléfono (011) 4374-5400 o envíe un mail a: revistacientifica@oftalmologos.org.ar

Lista de cotejo

Antes de enviar el manuscrito sugerimos cotejar y marcar que cada una de las siguientes pautas se hayan verificado, incluir esta lista de cotejo en página aparte al final de la carta de solicitud de publicación:

- Manuscrito con el texto completo en archivo electrónico (Word de Microsoft Office, letra Times New Roman, tamaño 12, espaciado doble, indentado al principio del párrafo, alineado sólo a la izquierda).
- Texto organizado con cada una de las siguientes secciones comenzando en página aparte (ctrl+enter): 1) página de título, 2) resumen, 3) abstract, 4) texto (introducción, métodos, resultados y discusión), 5) bibliografía, 6) tablas, 7) leyendas de figuras (incluyendo gráficos).
- Bibliografía citada en forma consecutiva de acuerdo con el orden de mención en el texto.
- Tablas: cada una con título y numeradas en forma consecutiva de acuerdo con orden de mención en el texto.

- Figuras: cada una con su leyenda en forma consecutiva de acuerdo con el orden de mención en el texto.
 - Título de no más de 120 caracteres y sin abreviaturas, en español y en inglés.
 - Nombre y apellido completo de todos los autores y filiación académica de cada uno.
 - Nombre completo, institución, dirección de correo, teléfono y email del autor a quien debe ser dirigida la correspondencia.
 - Resúmenes en español y en inglés de no más de 250 palabras, estructurados de acuerdo con las instrucciones para los autores.
 - Cada figura (fotos, dibujos, gráficos y diagramas) están en el formato y tamaño solicitado y se envían cada uno en archivos independientes (NO deben estar "pegados" en el Word).
 - Cada archivo electrónico por separado y nombrado con el apellido del primer autor, título breve y número de la figura. Ejemplo: Pérez – Mixomaconjuntiva – Fig. 1.xxx (extensión automática del archivo, ya sea .doc, .tiff, .jpg, etc).
 - Si necesita más información comuníquese con el teléfono (011) 4374-5408 o envíe un mail a: revistacientifica@oftalmologos.org.ar
-

Instructions for authors

The *OPTALMOLOGÍA CLÍNICA Y EXPERIMENTAL* journal welcomes the submission of original manuscripts describing clinical investigation, surgical procedures and basic investigation, as well as case series reports, case reports, short communications, letters to the editor, systematic reviews and cases in grand rounds format for their publication. Original papers can be submitted in Spanish or in English.

The journal's Editorial Committee adheres to the principles of the International Committee of

Medical Journal Editors as well as to the tenets of the Declaration of Helsinki, and to the principles of maintenance and care for biomedical research involving animals of the Association of Research in Vision and Ophthalmology.

Manuscripts and images must be e-mailed to the following address: secretaria@ofthalmologos.org.ar.

Each manuscript must be accompanied by a cover letter explaining the originality of the paper submitted, and indicating that all authors have agreed to the manuscript's publication and uploading into the website. Should there be more than 5 (five) authors for original papers

and 3 (three) for all the other types of manuscripts listed above, the role and task performed by each author must be explained in written.

Papers including human subjects participating in experimental studies must mention that they have read and agreed to the principles set forth in the declarations for the participation of individuals and use of animals in experimental studies.

Papers involving intervention on patients or containing epidemiologic information of individuals must include a letter of approval from the appropriate Institutional Ethics Committee.

General instructions

Manuscripts, written in Word software (Microsoft Office), must be double-spaced using Times New Roman font size 12, regular format (i.e. neither using bold or italic types) on letter size paper (21,6 x 26,9 cm) leaving 2,5 cm margins on all sides. Each page must be numbered consecutively from the first to the last one with a short title of the manuscript on it and using automated successive numbers. Though the maximum length of original papers is variable, in general, they must not exceed 6,000 words.

Basic format

a) Title page: title in Spanish and in English, authors and their affiliation, address and e-mail of the corresponding author, key

words in Spanish and in English. Any institution or company wholly or partially funding the paper must be included.

b) Abstract in Spanish not exceeding one page or 250 words. It must be *structured*, i.e. it must include the subheadings: Purpose/Objective, Methods, Results, and Conclusions.

c) Abstract in English: the same as the one in Spanish. Automated translations made by text processors will not be accepted.

d) Body of the manuscript divided into: **Introduction, Material and Methods*, Results and Discussion.**

e) References must be listed according to the format established for medical publications. They must be numbered consecutively by order of citation in the text.

* Epidemiological studies and comparative studies must follow the guidelines of clinical trials from Consort 10 (2007) (<http://www.consort-statement.org/>) that version (October 19, 2007). Statistical methods must be indicated in the manuscript whenever they are used – and the person in charge of statistical analysis must be mentioned in the cover letter. Only widely used abbreviations will be accepted and acronyms must be spelled out throughout an generally mentioned in journals of the specialty. Creation of new abbreviations is discouraged. Introduce such abbreviations in parentheses and the first use of the full name. The units of measurements used must be expressed according to the International System of Units (SI). Any explanation must be made by using the full name only of symbols. *J. G. N. R. M.* 2007; 17: 17

Examples:

• **Journal article:**

Halpern SD, Ubel PA, Caplan AL. Solid-organ transplantation in HIV-infected patients. *N Engl J Med* 2002; 347: 284-7.

• **Book:**

Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA. *Medical microbiology*, 4th ed. St. Louis: Mosby, 2002.

• **Electronic text in CD:**

Anderson SC, Paulsen KB. *Anderson's electronic atlas of hematology (CD-ROM)*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2002.

• **Websites on the internet:**

Cancer-Pain.org (website). New York: Association of Cancer Online Resources, Inc; ©2000-01 (updated May 16, 2002; cited; July 9, 2002). Available at: <http://www.cancer-pain.org/>

f) Tables must be created in Microsoft Word with spaces between columns made with the tab key. Each table must have a short title. Do not copy tables from Excel or PowerPoint. Tables must be numbered consecutively by order of citation in the text and they must not be placed between paragraphs within the body of the manuscript but at the end of it.

g) Image legends (figures and graphics). They must be numbered consecutively by order of citation in the text.

Images

Figures: they must be submitted in black and white (high-contrast grey-scale). The initial capture resolution must be at least 300 dpi with a minimum size not smaller 10 cm wide. They must be submitted in TIFF or JPEG uncompressed format. If they were subjected to Photoshop this must be described in detail in the cover letter. Color figures have an additional cost at the expense of the author/s. Combined figures must be created with Photoshop. Any letter or text within figures must be large enough so that when the image is reduced to 10 cm wide, they do not become smaller than 3 mm high. Use fully outlined letter types. **Do**

not use figures in PowerPoint. Figures must not contain any information on the patient neither the patient must be recognizable from the image unless he/she has given written consent. All images must be original and must not have been obtained from any digital source other than from the author himself. In case of images from other authors, the fact that due permission has been given for their publication must be mentioned in parenthesis in the figure legend.

Graphics: must be created with software for these purposes and submitted in TIFF or JPEG format with an initial resolution of 1200 dpi. Graphics in Excel or PowerPoint will not be accepted. Graphics will be printed in black and white, therefore, it is advisable to use clearly defined networks or patterns for different surfaces.

Special instructions for the different types of publications

Original papers. These can describe applied clinical investigations, surgical techniques, diagnostic procedures and basic experimental ophthalmic investigation. Overall, the guidelines mentioned above must be followed.

Short communications. These will be diagnostic findings, epidemiologic observations, therapeutic outcomes or adverse events, surgical maneuvers and other events that, due to their potential impact on daily ophthalmic practice, require their rapid conveyance to ophthalmologists.

Series and case. They will be structured as follows: Introduction, Case report, Comments. The summary will involve a brief unstructured description, including the reason of the presentation, the most outstanding information of what has been observed and the conclusion. The manuscript will have a maximum length of 1,000 words and it will include no more than 5 to 7 references and up to 4 representative photographs.

Letters to the Editor. They will be addressed to the editor and their text will not exceed 500 words. They can deal with statements or publications from the same journal or on other publications or communications in medical-scientific events.

Systematic reviews. These must involve an update of a renewed topic of interest and they

must be based on an accurate bibliographic search, reading and review. They must include an index of subtopics developed and indicate the databases (traditional and non-traditional) used, the method of literature search and the criteria for selection of articles.

Cases in grand rounds format. Manuscripts must include: 1) initial page (the same as in any other paper); 2) case presentation, together with the information necessary for tentative diagnosis; 3) discussion, including differential diagnoses and procedures that may help make a diagnosis; 4) results of diagnostic procedures; 5) diagnosis; 6) follow-up; 7) comments, and 8) references. Instead of a summary, at the end of the manuscript, there will be a brief account of the case presented.

Images in ophthalmology. One or two figures exceptionally illustrative of a disease or the evolution or surgical resolution of a disease will be accepted. The images must follow the rules for submission of figures described above. The manuscript –excluding the title, authors and references– must not exceed 250 words. A maximum of three references will be accepted.

Additional information

International Committee of Medical Journal Editors. *Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals: writing and editing for biomedical publication.* Available at: <http://www.icmje.org> (updated February 2006, last access: November 19, 2007).

Note: the goal of the Editorial Committee is to achieve a level of excellence in papers accepted for publication in order to have access to international medical information databases. Both the Editorial Committee and the authorities of the "Consejo Argentino de Oftalmología" (Argentinean Council of Ophthalmology) are aware of how difficult it is for primary care ophthalmologists to prepare papers; therefore, the secretariat of the journal will be willing to provide the adequate technical means to all those authors requiring support.

For further information, please contact us by phone number (011) 4374-5400 or by mail to: revistacientifica@oftalmologos.org.ar

Checklist of OCE submission

Before submitting the manuscript, and once you have verified you have complied with the guidelines, we suggest that you check the corresponding box. Please include this checklist on a separate page at the end of the cover letter.

- Manuscript with the full text as a digital file (Microsoft Office Word, Times New Roman font size 12, double-spacing, indentation only at the beginning of each paragraph; use left alignment only).
- The text must be organized according to the following sections, each one beginning on a separate page (ctrl+enter): 1) Title page; 2) Abstract in Spanish; 3) Abstract in English; 4) Body of the manuscript (Introduction, Methods, Results and Discussion); 5) References; 6) Tables; 7) Figure legends (including graphics legends).
- References listed consecutively by order of citation in the text.
- Tables: each one with its title and numbered consecutively by order of citation in the text.
- Figures: each one with its legend and numbered consecutively by order of citation in the text.
- Title not exceeding 120 characters and with no abbreviations, in Spanish and in English.
- Each author's complete name and affiliation.
- The complete name, institution, address, phone number, and e-mail address of the Corresponding Author.
- Abstracts in Spanish and in English not exceeding 250 words, structured as stated under title "Instructions for authors".
- Each image (photographs, drawings, graphics, diagrams) in the format and size requested and in separate files.
- Each component must be prepared in a separate file with its name including the first author's name as well as a short title, text/letter (cover)/fig#, e.g. Raggio -conjunctivalmiyoma - fig1.doc (automated file extension, whether .jpg, .tiff, etc.).

Instruções para os autores

A revista *Oftalmologia Clínica y Experimental* aceita trabalhos originais de investigação clínica, procedimentos cirúrgicos e investigação fundamental; informes de séries de casos, informes de casos, comunicações breves, cartas de leitores, trabalhos de revisões sistemáticas e casos em formato de ateneus. Os trabalhos originais poder ser enviados em espanhol, inglês ou português.

O comitê editorial da revista adere aos princípios estabelecidos pelo International Committee of Medical Journal Editors, ajusta-se

aos princípios da Declaração de Helsinski e aos princípios de cuidado de animais para experimentação da Association for Research in Vision and Ophthalmology.

Os manuscritos e as imagens devem ser enviados por correio eletrônico ao seguinte endereço: secretaria@oftalmologos.org.ar

Cada manuscrito deve estar acompanhado por uma carta na qual se indique a originalidade do trabalho enviado, com a assinatura de conformidade de todos os autores para que o trabalho seja publicado na revista e no site. No caso de mais de 5 (cinco) autores para trabalhos originais e 3 (três) auto-

res para os demais tipos de trabalho, deve-se justificar por escrito a participação dos autores e a tarefa que cada um realizou.

Os trabalhos que incluam sujeitos experimentais devem mencionar ter lido e aceitar os princípios estabelecidos nas declarações para o uso de indivíduos e animais em projetos experimentais.

Os trabalhos com intervenção em pacientes ou com informação epidemiológica de indivíduos devem estar acompanhados por uma carta de aprovação do Comitê de ética da instituição onde tenha sido realizado o trabalho.

Instruções gerais

Todos os trabalhos devem ser escritos com o programa Word (Microsoft Office) em páginas tipo carta 21,6 x 26,9 cm deixando 2,5 cm de espaço nas quatro margens, utilizando a letra *Times New Roman*, tamanho de corpo 12, em formato "normal" (sem negrito nem cursiva) e com linhas de espaço duplo. Cada página deve ser numerada consecutivamente desde a primeira até a última com o título abreviado do trabalho e números correlativos automáticos. Embora a extensão dos trabalhos originais tenha um limite variável, em geral, não devem superar as 6.000 palavras.

O formato básico inclui

a) Página inicial: título em português e inglês, autores e filiação acadêmica, endereço e e-mail do autor responsável; palavras-chave

em português e em inglês. Deve-se incluir toda instituição ou indústria que tenha financiado uma parte ou a totalidade do trabalho.

b) Resumo em português que não ocupe mais de uma página ou 250 palavras. A sua estrutura deverá incluir os subtítulos: Objetivo, Métodos, Resultados e conclusões.

c) Abstract (inglês) da mesma extensão do resumo e estruturado também segundo esses itens: *Purpose, Methods, Results e Conclusions*. Não serão aceitas traduções automáticas com processadores de texto.

d) O corpo do trabalho deve estar dividido em: *Introdução, Material e métodos, Resultados e Discussão*.

e) As referências bibliográficas devem concordar com o formato das publicações médicas. Numeradas em forma consecutiva segundo a ordem de menção no texto.

Os trabalhos de português e inglês correspondentes devem seguir os procedimentos de envio e envio para Checklist and E-Flowschart, Access: <http://www.comportamento.org/olimpia/convocatoria/13/convocatoria-de-2010/>. Agradecemos que inclua no envio o número de correio eletrônico de correspondência e a carta de apresentação representando a revista e a instituição. Os autores devem ser listados em português e incluídos em inglês juntamente com o título em publicação de acessibilidade. O prazo máximo de entrega de manuscritos é 30 dias após a publicação. A primeira página do artigo e o abstract deve ter no máximo 1000 palavras originais (10). A acessibilidade à qualidade de vida humana é o objetivo internacional de saúde pública (11). Para as citações devem utilizar o seguinte sistema de citação: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500, 501, 502, 503, 504, 505, 506, 507, 508, 509, 510, 511, 512, 513, 514, 515, 516, 517, 518, 519, 520, 521, 522, 523, 524, 525, 526, 527, 528, 529, 530, 531, 532, 533, 534, 535, 536, 537, 538, 539, 540, 541, 542, 543, 544, 545, 546, 547, 548, 549, 550, 551, 552, 553, 554, 555, 556, 557, 558, 559, 560, 561, 562, 563, 564, 565, 566, 567, 568, 569, 570, 571, 572, 573, 574, 575, 576, 577, 578, 579, 580, 581, 582, 583, 584, 585, 586, 587, 588, 589, 590, 591, 592, 593, 594, 595, 596, 597, 598, 599, 600, 601, 602, 603, 604, 605, 606, 607, 608, 609, 610, 611, 612, 613, 614, 615, 616, 617, 618, 619, 620, 621, 622, 623, 624, 625, 626, 627, 628, 629, 630, 631, 632, 633, 634, 635, 636, 637, 638, 639, 640, 641, 642, 643, 644, 645, 646, 647, 648, 649, 650, 651, 652, 653, 654, 655, 656, 657, 658, 659, 660, 661, 662, 663, 664, 665, 666, 667, 668, 669, 670, 671, 672, 673, 674, 675, 676, 677, 678, 679, 680, 681, 682, 683, 684, 685, 686, 687, 688, 689, 690, 691, 692, 693, 694, 695, 696, 697, 698, 699, 700, 701, 702, 703, 704, 705, 706, 707, 708, 709, 710, 711, 712, 713, 714, 715, 716, 717, 718, 719, 720, 721, 722, 723, 724, 725, 726, 727, 728, 729, 730, 731, 732, 733, 734, 735, 736, 737, 738, 739, 740, 741, 742, 743, 744, 745, 746, 747, 748, 749, 750, 751, 752, 753, 754, 755, 756, 757, 758, 759, 760, 761, 762, 763, 764, 765, 766, 767, 768, 769, 770, 771, 772, 773, 774, 775, 776, 777, 778, 779, 780, 781, 782, 783, 784, 785, 786, 787, 788, 789, 790, 791, 792, 793, 794, 795, 796, 797, 798, 799, 800, 801, 802, 803, 804, 805, 806, 807, 808, 809, 810, 811, 812, 813, 814, 815, 816, 817, 818, 819, 820, 821, 822, 823, 824, 825, 826, 827, 828, 829, 830, 831, 832, 833, 834, 835, 836, 837, 838, 839, 840, 841, 842, 843, 844, 845, 846, 847, 848, 849, 850, 851, 852, 853, 854, 855, 856, 857, 858, 859, 860, 861, 862, 863, 864, 865, 866, 867, 868, 869, 870, 871, 872, 873, 874, 875, 876, 877, 878, 879, 880, 881, 882, 883, 884, 885, 886, 887, 888, 889, 890, 891, 892, 893, 894, 895, 896, 897, 898, 899, 900, 901, 902, 903, 904, 905, 906, 907, 908, 909, 910, 911, 912, 913, 914, 915, 916, 917, 918, 919, 920, 921, 922, 923, 924, 925, 926, 927, 928, 929, 930, 931, 932, 933, 934, 935, 936, 937, 938, 939, 940, 941, 942, 943, 944, 945, 946, 947, 948, 949, 950, 951, 952, 953, 954, 955, 956, 957, 958, 959, 960, 961, 962, 963, 964, 965, 966, 967, 968, 969, 970, 971, 972, 973, 974, 975, 976, 977, 978, 979, 980, 981, 982, 983, 984, 985, 986, 987, 988, 989, 990, 991, 992, 993, 994, 995, 996, 997, 998, 999, 1000.

Exemplos:

• **Artigos em revistas:**

Halpern SD, Ubel PA, Caplan AL. Solid-organ transplantation in HIV-infected patients. *N Engl J Med* 2002; 347:284-7.

• **Livro:**

Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA. *Medical microbiology*. 4^a ed. St. Louis: Mosby, 2002.

• **Texto eletrônico em CD:**

Anderson SC, Ivulsen KB. *Anderson's electronic atlas of hematology* [CD-ROM]. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2002.

• **Sítios:**

Cancer-Pain.org [site na internet]. New York: Association of Cancer Online Resources, Inc.; c2000-01 [atualizado 2002 maio 16; citado 2002 julho 9]. Disponível em: <http://www.cancer-pain.org/> (consultado o dia 20 de janeiro de 2010)

f) Tabela/s escrita/s em Word com espaços entre colunas feitos com o tabulador. Cada tabela deve ter um título breve. Não copiar tabelas de Excel ou Power Point. Cada tabela deve ser numerada em forma consecutiva segundo tenha sido mencionada no texto. Incluir as tabelas no final do manuscrito e não entre os parágrafos do texto.

g) Legendas das ilustrações (figuras e gráficos). Numerada em forma consecutiva segundo tenham sido mencionadas no texto.

Ilustrações

Figuras. Devem ser em branco e preto (escala de cinzas de alto contraste). A resolução de captura inicial das imagens não deve ser menor de 300 dpi e o tamanho mínimo é de 10 cm de largo. Serão enviados em formato TIFF ou JPG *sem comprimir*. No caso de terem sido retocadas no Photoshop deve aclarar-se qual foi a modificação feita na carta que acompanha o envio do manuscrito. As figuras em cores têm um custo adicional a cargo dos autores. As figuras combinadas devem ser realizadas no Pho-

shop. As letras ou textos dentro das figuras tem que ter um tamanho tal que ao reduzir a imagem a 10 cm de largo, as letras não podem ser menores que 3 mm de largo. Utilizar letras de traços cheios. *Não utilizar figuras extraídas de apresentações de PowerPoint.* Nenhuma figura deve conter informação do paciente e ele não pode ser reconhecido através da imagem exceto que tenha dado seu consentimento por escrito.

Importante: Todas as imagens devem ser originais e não podem ser obtidas de nenhum meio digital que não seja do próprio autor. Caso as imagens sejam cedidas por outro autor, isso deve estar mencionado entre parêntesis na legenda da figura.

Gráficos. Os gráficos devem ser realizados em programas destinados a esse fim e guardados em formato TIFF ou JPG com resolução inicial de 1200 dpi. Não se devem enviar gráficos realizados em Excel ou Power Point. Os gráficos serão impressos em branco e preto e aconselha-se o uso de tramas claramente definidas para distintas superfícies.

Instruções particulares para os distintos formatos

Trabalhos originais. Podem ser de investigação clínica, clínica aplicada, técnicas cirúrgicas, procedimentos diagnósticos e de investigação oftalmológica experimental básica. Serão seguidos os alinhamentos previamente mencionados em termos gerais.

Comunicações breves. Serão descobertas diagnósticas, observações epidemiológicas, resultados terapêuticos ou efeitos adversos, manobras cirúrgicas e outros eventos que pela sua importância no manejo diário da prática oftalmológica requerem de uma comunicação rápida para os médicos oftalmologistas.

Séries e casos. Serão estruturadas em: *Introdução, estudo de caso, Comentários.* O resumo consistirá em uma breve descrição não estruturada que inclua o porquê da apresentação, a informação mais destacada do observado e uma conclusão. O texto terá uma extensão máxima de 1000 palavras incluindo até 5 ou 7 referências bibliográficas e até 4 fotografias representativas.

Cartas de leitores. Serão dirigidas ao editor e seu texto não poderá exceder 500 palavras.

Podem tratar sobre os fatos e publicações na mesma revista ou comentários sobre outras publicações ou comunicações em eventos científicos médicos.

Revisões sistemáticas. Devem atualizar um tema de interesse renovado e devem realizar-se baseadas em uma precisa revisão, leitura e análise da bibliografia. Devem incluir um índice dos subtemas desenvolvidos, as bases de dados bibliográficas utilizadas (tradicional e não tradicional) e uma descrição de como foi realizada a busca e dos critérios de seleção das publicações.

Casos em forma de ateneus. Os manuscritos devem incluir 1) página inicial (igual que nos outros trabalhos), 2) apresentação do caso com a informação necessária para realizar um diagnóstico provável, 3) Discussão incluindo diagnósticos diferenciais e procedimentos que possam colaborar na realização do diagnóstico, 4) resultados dos procedimentos diagnósticos, 5) diagnóstico, 6) seguimento, 7) comentários y 8) bibliografia. Em vez do resumo final do manuscrito será realizada uma síntese sumária do caso apresentado.

Imagens em oftalmologia. Serão recebidas uma ou duas figuras que ilustrem em forma excepcionalmente clara uma doença, evolução ou resolução cirúrgica. As imagens seguirão as

normas requeridas para ilustrações. O texto excluindo o título, autores e bibliografia, não deverá exceder 250 palavras. Poderão ser incluídas até 3 referências bibliográficas.

Informação suplementária

International Committee of Medical Journal Editors, *Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals: writing and editing for biomedical publication*. Disponível em <http://www.icmje.org>, [atualizado em abril de 2010, consultado o dia: 19 de novembro de 2010].

Nota: O objetivo do Comitê editorial é alcançar um nível de excelência nos trabalhos aceitos para sua publicação com o fim de acessar a bases de dados de informação médica internacional. Tanto o Comitê editorial quanto as autoridades do Conselho Argentino de Oftalmologia são conscientes das dificuldades que tem um oftalmologista de atenção primária para a realização de trabalhos, é por isso que através da secretaria da revista vai apoiar-se com os meios técnicos adequados a aqueles autores que o solicitem.

Para mais informações, comunique-se no seguinte telefone: (011) 4374-5400 ou envie um e-mail a: revistacientifica@oftalmologos.org.ar

Lista de verificação

Antes de enviar o manuscrito sugerimos controlar e marcar que cada uma das seguintes pautas tenham sido verificadas: incluir essa lista de verificação em uma página separada no final da carta de solicitação de publicação.

- Manuscrito com o texto completo em arquivo eletrônico (Word de Microsoft Office, letra Times New Roman, tamanho 12, duplo espaço, recuo no começo do parágrafo, alinhado só na esquerda).
- Texto organizado em cada uma das seguintes seções começando em uma página aparte (end+enter): 1) página de título, 2) resumo, 3) abstract, 4) texto (introdução, métodos, resultados y discussão), 5) bibliografía, 6) tabelas, 7) legendas de figuras (incluindo gráficos).
- Bibliografía citada em forma consecutiva concordando com a ordem de menção no texto.
- Tabelas: cada uma com um título e numeradas em forma consecutiva seguindo a ordem de menção no texto.
- Figuras: cada uma com suas legendas em forma consecutiva seguindo a ordem de menção no texto.
- Título de até 120 caracteres e sem abreviaturas, em português e em inglês.
- Nome e sobrenome completo de todos os autores e filiação acadêmica de cada um deles.
- Nome completo, instituição, endereço de correio postal, telefone, e-mail do autor a quem deve ser dirigida a correspondência.

- ❑ Resumos em português e em inglês de até 250 palavras, estruturados segundo as instruções para os autores.
- ❑ Cada figura (fotos, desenhos, gráficos e diagramas) está no formato e tamanho solicitados e cada um deve ser enviado em um arquivo independente (não devem estar "colados" no Word).
- ❑ Cada arquivo eletrônico por separado e nomeado como sobrenome do primeiro autor, título breve e número da figura. Exemplo: Pérez - Mixomaconjuntiva - Fig. 1.xxx (extensão automática do arquivo, seja .doc, .tiff, .jpg, etc).

OPTICA DE PRECISION

Experiencia e innovación para brindar la máxima calidad visual

- 👁️ Tallado digital con puntas de diamante
- 👁️ Determinación de coeficiente de movimiento de ojos/cabeza
- 👁️ Medida de posición del centro de rotación del ojo

Nuestra recomendación es la visita
periódica al médico oftalmólogo



Foucault
Laboratorio Optico Acerbi



Visite nuestra web con
su smartphone

AYACUCHO 228 |(C1025AAF)| CIUDAD DE BUENOS AIRES

TELÉFONOS: 4950-0000 | 4953-2220 | 4953-4810

www.foucaultacerbi.com.ar



CAO Consejo Argentino
de Oftalmología

Tte. Gral. Juan D. Perón 1479, PB
C1037ACA Buenos Aires, Argentina
Teléfono 54 (11) 4374-5400 líneas rotativas

OFTALMOLOGÍA Clínica y Experimental

www.oftalmologos.org.ar/publicaciones/OCE/