

IX Congreso nacional de la Asociación de Investigación en Visión y Oftalmología (AIVO) (parte 2)

9th National meeting of the “Asociación de Investigación en Visión y Oftalmología” (AIVO) [Association for Research in Vision and Ophthalmology] (part 2)

IX Congresso nacional da Associação de Investigação em Visão y Oftalmología (AIVO) [Associação para Pesquisa em Visão e Oftalmologia](parte 2)

INVESTIGACIONES PRESENTADAS / RESEARCH PAPERS PRESENTED / PESQUISAS APRESENTADAS

(Continuación / Continues / Continuação)

Films de ácido hialurónico entrecruzado como sistemas de liberación de fármacos oftálmicos

Calles JA^{a,b}, Palma SD^c, Vallés EM^a

^aPlanta Piloto de Ingeniería Química (PLAPIQUI-CONICET), Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca.

^bDepartamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca.

^cUnidad de Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología Farmacéutica (UNITEFA-CONICET), Universidad Nacional de Córdoba.

javieradcalles@gmail.com

Objetivos. Evaluar las propiedades biofarmacéuticas de nuevos sistemas portadores de fármacos (SPF) desarrollados a partir de modificaciones estructurales del ácido hialurónico (AH) con potenciales aplicaciones en farmacoterapia oftalmológica.

Métodos. Se sintetizó un nuevo material a partir del AH mediante entrecruzamiento químico con polietilenglicol-diglicidil-éter, obteniéndose films por evaporación de solvente. Para evaluar bioadhesividad, po-

sibles efectos irritantes y eficacia terapéutica (presión intraocular, PIO) se utilizaron conejos albinos normotensos de raza New Zealand con un peso entre 2-2,5 kg.

Los test de bioadhesión e irritación se realizaron según un método desarrollado en nuestro laboratorio utilizando 6 conejos a los que se les colocó una muestra de 4 mm de diámetro en el ojo derecho, evaluando su adhesión a los tejidos oculares; el daño producido se estudió mediante test Draize modificado.

La PIO se evaluó en 12 conejos normotensos colocándoles un film cargado con maleato de timolol (MT) de 4 mm de diámetro cuantificando el descenso de la presión, comparando con un colirio comercial.

Resultados. Los sistemas obtenidos mostraron buenas propiedades bioadhesivas y de compatibilidad con los tejidos oculares. Los films presentaron una adherencia de alrededor de tres días, siendo significativa durante las primeras 8 horas.

Los films entrecruzados mostraron mínima irritación conjuntival y corneal. Por otro lado, no se observó ninguna irritación intraocular durante las 72 horas de estudio.

La formulación cargada con MT mostró una adecuada respuesta terapéutica, incluso superando al colirio comercial. El sistema logró un rápido descenso de la

PIO, similar al colirio, con un pico cercano a las 2 horas pos administración, manteniendo un efecto hipotensor por aproximadamente 3 horas más que la formulación comercial.

Conclusiones. Los films obtenidos han exhibido características apropiadas para diseñar un SPF de aplicación oftálmica debido a su biocompatibilidad con los tejidos oculares y teniendo en cuenta el efecto sobre la PIO observado. No obstante deben realizarse estudios complementarios en cuanto a su capacidad como plataforma versátil para vehiculizar diferentes fármacos que garanticen la robustez del sistema.

Subsidios. CONICET, UNS y UNC.

Hyaluronan cross-linked films in ophthalmic drug delivery

Objectives. To evaluate the biopharmaceutical properties of new drug-carrier systems (DCS) developed from structural modifications of hyaluronic acid (HA), with potential applications in ophthalmic pharmacotherapy.

Methods. By synthesizing a new material from HA by chemical cross-linking with polyethylene glycol diglycidyl ether, we obtained films through solvent evaporation. To evaluate bioadhesiveness, possible irritant effects and therapeutic efficacy (intraocular pressure, IOP), normotensive New Zealand albino rabbits weighing between 2 and 2.5 kg were used. Bioadhesiveness and irritation tests were performed according to a method developed in our laboratory using 6 rabbits, in the right eye of which was placed a 4-mm diameter sample, and adhesion to ocular tissues and damage caused were studied by means of the modified Draize test.

IOP was measured in 12 normotensive rabbits by placing a 4-mm diameter film loaded with timolol maleate (TM); IOP decrease was quantitated and compared with commercially available eyedrops.

Results. The systems obtained evidenced good bioadhesive properties as well as good compatibility with ocular tissues. Films had an adherence of near three days, which was significant during the first 8 hours. Cross-linked films exhibited minimum conjunctival and corneal irritation. On the other hand, there was no intraocular irritation within 72 hours of the study.

The formulation loaded with TM exhibited adequate therapeutic response, even exceeding that of the

commercial eyedrops. The system produced rapid IOP decrease, similar to that of the eyedrops, with a peak close to 2 hours post-administration, and maintaining the hypotensive effect for near 3 additional hours vs. the commercial formulation.

Conclusions. The films obtained have evidenced appropriate characteristics for the design of a DCS for ophthalmic use due to their biocompatibility with ocular tissues and considering the effect observed on IOP. However, these studies should be supplemented in terms of their ability as a versatile platform for vehiculation of different drugs ensuring the robustness of the system.

Support. CONICET, UNS and UNC

Filmes de ácido hialurônico reticulado como sistemas de liberação de fármacos oftálmicos

Objetivos. Avaliar as propriedades biofarmacêuticas de novos sistemas portadores de fármacos (SPF) desenvolvidos a partir de modificações estruturais do ácido hialurônico (AH) com potenciais aplicações em farmacoterapia oftalmológica.

Métodos. Sintetizou-se um novo material a partir do AH mediante entrecruzamento químico com polietilenglicol-diglicidil-éter, e se obtiveram filmes por evaporação de solvente. Para avaliar bioadesividade, possíveis efeitos irritantes e eficácia terapêutica (pressão intraocular, PIO) utilizaram-se coelhos albinos normotensos de raça New Zealand com um peso entre 2-2,5 kg. Os testes de bioadesão e irritação foram realizados segundo um método desenvolvido no nosso laboratório utilizando 6 coelhos nos quais foi colocada uma amostra de 4 mm de diâmetro no olho direito, avaliando sua adesão aos tecidos oculares; o dano produzido foi estudado mediante teste Draize modificado.

A PIO foi avaliada em 12 coelhos normotensos colocando neles um filme carregado com maleato de timolol (MT) de quatro mm de diâmetro quantificando o descenso da pressão, comparando com um colírio comercial.

Resultados. Os sistemas obtidos mostraram boas propriedades bioadesivas e compatibilidade com os tecidos oculares. Os filmes apresentaram uma aderência aproximada de três dias, sendo significativa durante as primeiras oito horas.

Os filmes entrecruzados mostraram mínima irri-taçãO conjuntival e corneana. Por outro lado, nao foi observada qualquer irri-taçãO intraocular durante as 72 horas de estudo.

A formulaçãO carregada com MT mostrou uma ade-quada resposta terapêutica, superando até mesmo o colírio comercial. O sistema conseguiu um rápido des-censo da PIO, semelhante ao colírio, com um máximo próximo às 2 horas após a administraçãO, mantendo um efeito hipotensor por aproximadamente 3 horas mais do que a formulaçãO comercial.

Conclusões. Os filmes obtidos têm exibido caracte-rísticas apropriadas para desenvolver um SPF de aplicaçãO oftálmica devido a sua biocompatibilidade com os tecidos oculares, levando em consideraçãO o efeito sobre a PIO observado. No entanto, é preciso realizar estudos complementares quanto à capacidade como plataforma versátil para a veiculaçãO de diferentes fármacos que ga-rantam a robustez do sistema.

Subsídios. CONICET, UNS e UNC.

Sistemas liposomales utilizando 5-MCA-NAT para el potencial tratamiento del glaucoma

Quinteros DA^a, Vicario de la Torre M^b, Andrés-Guerrero V^b, Palma SD^a, Herrero Vanrell R^a, Allemandi DA^a, Molina Martínez IT^b

^aUnidad de Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología Farmacéutica (UNITEFA-CONICET), Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba.

^bDepartamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense, Madrid.

danielaq@fcq.unc.edu.ar

Objetivo. Los liposomas (Lps) son vesículas compuestas por una o múltiples bicapas fosfolipídicas concéntricas que presentan un entorno acuoso en su interior. Recientemente se han empleado para el tratamiento del ojo seco con unos resultados alentadores. Los liposomas podrían ser sumamente ventajosos para el tratamiento de patologías en las que la superficie ocular se encuentra alterada o en aquellas en las que se necesita de un tratamiento crónico que puede dar lugar a una alteración de

la superficie, como es el caso de la terapia hipotensora en el glaucoma. En cuanto a la eficacia hipotensora, estudios previos demostraron que el derivado de la melatonina 5-metoxycarbonilamino-N-acetilriptamina (5-MCA-NAT) es capaz de reducir la presión intraocular de forma eficaz.

Este trabajo se propone la vehiculización de 5-MCA-NAT en liposomas adicionados con polímeros bioadhesivos (carboximetilcelulosa CMC, ácido hialurónico, HA) con el objetivo de evitar los efectos derivados de la administración crónica y favorecer al mismo tiempo la penetración de la molécula activa a través de la córnea.

Métodos.

- Método de cuantificación de 5-MCA-NAT por HPLC: columna C18 F.M.: MeOH:H₂O (40:60). Flujo 0.8 ml/min, λ₂₄₄ nm.
- Formulaciones: solución de 5-MCA-NAT, Lps/5-MCA-NAT, Lps/5-MCA-NAT/0.2% HA, Lps/5-MCA-NAT/0.5% CMC.
- Caracterización físico-química: pH, osmolaridad, potencial zeta, tamaño de partícula, reología.
- Medición de la PIO: se cuantificó la PIO (n=10 conejos) en ambos ojos utilizando un tonómetro marca Tonovet cada hora, durante un periodo de 8. Se obtiene como PIO basal la formulación correspondiente en ausencia del fármaco.

Los Lps mostraron un tamaño de partícula de 140 a 160 nm siendo sistemas iso-osmóticos, con pH ligeramente ácido y potencial electrocinético alto y positivo.

La medición de la PIO permitió observar, en el caso de la solución de 5-MCA-NAT, un área debajo de la curva similar que para el caso de los Lps-5-MCA-NAT. Sin embargo, estos últimos presentaron un efecto que se prolonga por más de 8 horas.

Por otra parte, el agregado de polímeros bioadhesivos tales como HA o CMC, produjeron un aumento notable de la efectividad hipotensora manteniendo el efecto prolongado del sistema.

Conclusiones. Los Lps formulados con polímeros bioadhesivos demostraron mayor eficiencia en la disminución de la presión intraocular lo cual sugiere que pueden utilizarse a futuro en el tratamiento del glaucoma.

Subsídios. FONCyT, CONICET, UNITEFA.

Liposomal systems using 5-MCA-NAT for the potential treatment of glaucoma

Objective. Liposomes (Lps) are vesicles made up of one or multiple concentric phospholipid bilayers with an aqueous environment inside. Recently, they have been used for the treatment of dry eye with promising results. Liposomes could be highly advantageous for the treatment of diseases in which the ocular surface is altered or for those in which chronic treatment that can lead to surface alteration is required, as in the case of hypotensive therapy for glaucoma. As regards their hypotensive efficacy, previous studies have demonstrated that the melatonin derivative 5-methoxycarbonylamino-N-acetyltryptamine (5-MCA-NAT) is capable of reducing intraocular pressure efficaciously.

This paper proposes the vehiculization of 5-MCA-NAT in liposomes with added bioadhesive polymers (carboxymethyl cellulose: CMC, hyaluronic acid: HA) in order to prevent the effects derived from chronic administration and simultaneously favor penetration of the active molecule through the cornea.

Methods.

- Method for 5-MCA-NAT quantification by HPLC: C18 column F.M.: MeOH:H₂O (40:60). Flow 0.8 ml/min, λ 244 nm.
- Formulations: 5-MCA-NAT solution, Lps/5-MCA-NAT, Lps/5-MCA-NAT/0.2% HA, Lps/5-MCA-NAT/0.5% CMC.
- Physicochemical characterization: pH, osmolarity, zeta potential, particle size, rheology.
- IOP measurement: IOP was quantified (n = 10 rabbits) in both eyes using a Tonovet tonometer every hour for 8 hours. Baseline IOP is obtained as the corresponding formulation in the absence of the drug.
- Lps showed a particle size of 140 to 160 nm; they are isosmotic systems, with a slightly acid pH and high and positive electrokinetic potential.

IOP measurement revealed, in the case of the 5-MCA-NAT solution, an area below the curve similar to that of Lps-5-MCA-NAT. Nevertheless, these latter ones, had an effect that extended over more than 8 hours.

On the other hand, the addition of bioadhesive polymers such as HA or CMC, produced a marked increase in the hypotensive effectiveness, thus maintaining the prolonged effect of the system.

Conclusions. Lps formulated with bioadhesive polymers were proven to be more efficient for intraocular pressure lowering, thus suggesting that they can be used in the future for the treatment of glaucoma.

Supports. FONCyT, CONICET, UNITEFA

Sistemas lipossomais utilizando 5-MCA-NAT para o potencial tratamento do glaucoma

Objetivo. Os lipossomas (Lps) são vesículas compostas por uma ou múltiplas bicamadas fosfolipídicas concêntricas que apresentam um ambiente aquoso no interior. Recentemente foram empregados para o tratamento do olho seco com resultados alentadores. Os lipossomas poderiam ser sumamente vantajosos para o tratamento de patologias em que a superfície ocular está alterada ou em aquelas nas quais é preciso um tratamento crônico que possa dar lugar a uma alteração da superfície, como no caso da terapia hipotensora no glaucoma. Quanto à eficácia hipotensora, estudos prévios demonstraram que o derivado da melatonina 5-metoxicarbonilamino-N-acetiltryptamina (5-MCA-NAT) pode reduzir a pressão intra-ocular de forma eficaz.

Este trabalho se propõe a veiculação de 5-MCA-NAT em lipossomas adicionados com polímeros bioadesivos (carboximetilcelulose CMC, ácido hialurônico, HA) com o objetivo de evitar os efeitos derivados da administração crônica e favorecer ao mesmo tempo a penetração da molécula ativa através da córnea.

Métodos.

- Método de quantificação de 5-MCA-NAT por HPLC: coluna C18 F.M.: MeOH:H₂O (40:60). Fluxo 0.8 ml/min, λ 244 nm.
- Formulações: solução de 5-MCA-NAT, Lps/5-MCA-NAT, Lps/5-MCA-NAT/0.2% HA, Lps/5-MCA-NAT/0.5% CMC.
- Caracterização físico-química: pH, osmolaridade, potencial zeta, tamanho da partícula, reologia.
- Medição da PIO: foi quantificada a PIO (n=10 coelhos) em ambos os olhos utilizando um *tonômetro* marca Tonovet a cada uma hora, durante um período de oito. Obtém-se como PIO basal a formulação correspondente em ausência do fármaco.

Os Lps mostraram um tamanho de partícula de 140 a 160 nm sendo sistemas iso-osmóticos, com pH ligeiramente ácido e potencial eletrocinético alto e positivo.

A medição da PIO permitiu observar, no caso da solução de 5-MCA-NAT, uma área abaixo da curva semelhante à do caso dos Lps-5-MCA-NAT. No entanto, estes últimos apresentaram um efeito prolongado por mais de oito horas.

Por outro lado, a adição de polímeros bioadesivos tais como HA ou CMC, produziram um aumento significativo da efetividade hipotensora mantendo o efeito prolongado do sistema.

Conclusões. Os Lps formulados com polímeros bioadesivos demonstraram maior eficiência na diminuição da pressão intraocular. Isso sugere que podem ser utilizados no futuro no tratamento do glaucoma.

Subsídios. FONCyT, CONICET, UNITEFA.

Films bioadhesivos como sistemas terapéuticos para el potencial tratamiento del glaucoma

Tártara L, Allamendi D, Palma S, Llabot J

UNITEFA, Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba.
i.tartara@gmail.com

Introducción. El diseño de sistemas bioadhesivos para el tratamiento de afecciones oculares representa un gran desafío tecnológico, ya que deben optimizarse propiedades de adhesión (tiempo de permanencia), flexibilidad, liberación modificada y aceptación por parte del paciente, lo que implica la adecuada selección de excipientes y procesos de obtención. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la eficacia de sistema bioadhesivos utilizando acetazolamida (AZM) como fármaco modelo.

Materiales y métodos. Se obtuvieron films a partir de mezclas de polímeros, un plastificante y AZM que luego se recubrieron con una solución de polímero y plastificante. Se estudió el comportamiento del film en términos de adhesión, hinchazón e irritación con oftalmoscopia binocular indirecto en conejos New Zealand (n=6) y determinación de presión intraocular (PIO) con tonómetro manual, utilizándose conejos normotensos (n=12). La composición cuali-cuantitativa de polímeros

se omite en el presente resumen debido a la protección de patente en trámite.

Resultados. El sistema compuesto por el polímero A 27,9%, B 27,9% y C 27,9%, el plastificante D 3,9% y AZM 3,35%, recubierto con el polímero E 7,36% y el plastificante F 1,73% presentó el mejor desempeño, alcanzando una permanencia en la conjuntiva ocular de 48 horas con discreta variación de tamaño y espesor, sin presentar irritación. Los estudios *in vitro* mostraron una liberación sostenida de AZM durante 300 minutos. El descenso máximo de la PIO fue alcanzado a los 240 minutos (37%).

Conclusión. El anclaje de las formulaciones oftálmicas en la superficie ocular mejora la biodisponibilidad, la eficacia terapéutica y la potencial adherencia a los tratamientos. En este caso mediante el uso de film bioadhesivo se logra un efecto hipotensor importante en las primeras 7 horas pos-aplicación, manteniéndose adherido a la conjuntiva ocular durante 48 horas. Sobre la base de estos resultados promisorios se rediseñan las estrategias para la optimización de nuevos sistemas terapéuticos.

Subsídios. UNITEFA, CONICET, FONCyT.

Bioadhesive films as therapeutic systems for the potential treatment of glaucoma

Introduction. The design of bioadhesive systems for the treatment of ocular disorders represents a great technological challenge, since several properties must be optimized: adhesion (permanence time), flexibility, modified release and patient acceptance, and to achieve this, there must be adequate selection of excipients and obtainment processes. The purpose of this paper was to evaluate the efficacy of bioadhesive systems using acetazolamide (AZM) as a model drug.

Materials and methods. Films were obtained from the mixture of polymers, a plasticizer, and AZM coated with a polymer solution and plasticizer. The film behavior was studied in terms of adhesion, swelling and irritation with an indirect binocular ophthalmoscope in New Zealand rabbits (n = 6), and intraocular pressure (IOP) was measured with a hand-held tonometer, with the use of normotensive rabbits (n = 12). The quali-quantitative composition of polymers is not described here for the protection of the pending patent.

Results. The system consisting of polymers A 27.9%, B 27.9% and C 27.9%, the plasticizer D 3.9% and AZM 3.35%, coated with polymer E 7.36% and plasticizer F 1.73% showed the best performance, with a permanence of 48 hours in the ocular conjunctiva, discrete size and thickness variation and no irritation. *In vitro* studies evidenced a sustained release of AZM during 300 minutes. The maximum IOP drop was attained after 240 minutes (37%).

Conclusion. Anchorage of ophthalmic formulations to the ocular surface enhances bioavailability, therapeutic efficacy and potential adherence to therapy. In this case, a significant hypotensive effect is achieved within 7 hours post-application of the bioadhesive film, and adherence to the conjunctiva is maintained over 48 hours. Based on these promising results, strategies for the optimization of new therapeutic systems are redesigned.

Support. UNITEFA, CONICET, FONCyT.

Filmes bioadesivos como sistemas terapêuticos para o potencial tratamento do glaucoma

Introdução. O desenvolvimento de sistemas bioadesivos para o tratamento de afecções oculares representa um grande desafio tecnológico, já que devem ser otimizadas as propriedades de adesão (tempo de permanência), flexibilidade, liberação modificada e aceitação pelo paciente, o que implica a adequada seleção de excipientes e processos de obtenção. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a eficácia de sistemas bioadesivos utilizando acetazolamida (AZM) como fármaco modelo.

Materiais e métodos. Foram obtidos filmes a partir de misturas de polímeros, um plastificante e AZM que depois foram revestidos com uma solução de polímero e plastificante. Foi estudado o comportamento do filme em termos de adesão, inchaço e irritação com oftalmoscópio binocular indireto em coelhos New Zealand (n=6) e determinação de pressão intraocular (PIO) com tonômetro manual, com utilização de coelhos normotensos (n=12). A composição quali-quantitativa de polímeros é omitida neste resumo por razões de proteção da patente em trâmite.

Resultados. O sistema composto pelo polímero A 27,9%, B 27,9% e C 27,9%, o plastificante D 3,9% e AZM 3,35%, recoberto com o polímero E 7,36% e o plastificante F 1,73% apresentou o melhor desempen-

ho, atingindo uma permanência na conjuntiva ocular de 48 horas com discreta variação de tamanho e espessura, sem apresentar irritação. Os estudos *in vitro* mostraram uma liberação sustentada de AZM durante 300 minutos. O descenso máximo da PIO foi alcançado em 240 minutos (37%).

Conclusão. A ancoragem das formulações oftálmicas na superfície ocular melhora a biodisponibilidade, a eficácia terapêutica e a potencial aderência aos tratamentos. Neste caso mediante o uso de filme bioadesivo é obtido um efeito hipotensor importante nas primeiras 7 horas após a aplicação, mantendo-se aderido à conjuntiva ocular durante 48 horas. Com base nesses resultados promissórios são desenvolvidas as estratégias para a otimização de novos sistemas terapêuticos.

Subsídios. UNITEFA, CONICET, FONCyT.

Efecto del glaucoma experimental sobre la arquitectura glial del colículo superior

Bordone MP, Salido E, Rosenstein RE

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

melina_bordone@yahoo.com

Objetivos. El glaucoma es una disfunción ocular prevalente que se caracteriza por la pérdida progresiva de las funciones visuales, la muerte de células ganglionares retinales (CGR) y degeneración axonal. Aunque el glaucoma fue concebido como una enfermedad limitada al ojo, los axones de las RGC son extraoculares, con componentes intraorbitales e intracraneales. Hemos desarrollado un modelo de glaucoma experimental a través de la inyección semanal intracameral de condroitín sulfato (CSU) que reproduce aspectos centrales del glaucoma humano. El objetivo de este trabajo fue analizar el efecto de la hipertensión ocular crónica sobre la estructura axoglial del CS, la principal área de proyección retinal en la rata.

Métodos. Se inyectó semanalmente CSU (40%) o vehículo en la cámara anterior del ojo. Se analizó el flujo de información retino-colicular, la función de la vía

visual y la arquitectura astro y microglial del CS (por inmunohistoquímica de iba-1 y proteína gliofibrilar ácida [GFAP]).

Resultados. A partir de las 6 semanas de inyección de CSU disminuyó significativa y progresivamente el transporte anterógrado de la subunidad β de la toxina del cólera al CS. Se observó una caída significativa en la amplitud del componente N2-P2 de los potenciales visuales evocados a partir de las 6 semanas de hipertensión que progresó en períodos posteriores. Asimismo, a las 6 semanas de hipertensión ocular se observó un aumento significativo en la inmunorreactividad para la proteína microglial iba-1 y en el número de células microgliales iba-1 positivas, en tanto que a las 15 semanas se observó una marcada respuesta astrogial (GFAP) en el CS contralateral al ojo hipertenso.

Conclusiones. Estos resultados sugieren un “desconexión” funcional entre la retina y las vías visuales superiores en etapas tempranas de hipertensión ocular (cuando aún el número de CGR permanece inalterado), acompañada de alteraciones microgliales tempranas y astrogiales más tardías en el CS.

Subsidios. ANPCyT, CONICET, UBA.

Effect of experimental glaucoma on the superior colliculus glial architecture

Objetivos. Glaucoma is a prevalent ocular dysfunction characterized by progressive visual function loss, retinal ganglion cell (RGC) death and axonal degeneration. Though glaucoma was conceived as a disease limited to the eye, RGC axons are extraocular, with intraorbital and cranial components. We have developed an experimental glaucoma model via a weekly intracameral injection of chondroitin sulphate (CSU) that reproduces central aspects of human glaucoma. The goal of this paper was to analyze the effect of chronic ocular hypertension on the axoglial structure of the SC, the main area of retinal projection in rats.

Methods. CSU (40%) or vehicle was injected into the anterior chamber of the eye weekly. Parameters evaluated were: retino-collicular information flow, visual pathway function and astro- and microglial architecture of the SC (immunohistochemistry for iba-1 and glial fibrillary acidic protein [GFAP]).

Results. As from week 6 post-CSU injection, cholera toxin β -subunit anterograde transport to the SC

decreased significantly and progressively. There was a significant drop in the amplitude of the N2-P2 component of visual evoked potentials as from week 6 of hypertension that progressed in subsequent periods.

Furthermore, on week 6 of ocular hypertension there was a significant increase in immunoreactivity for the microglial protein iba-1 and in the number of iba-1(+) microglial cells, while on week 15 there was a marked astrogial response (GFAP) in the SC contralateral to the hypertensive eye.

Conclusions. These results suggest that there is a functional “disconnection” between the retina and the superior visual pathways in the early stages of ocular hypertension (when the number of RGCs still remains unchanged), accompanied by early microglial and later astrogial alterations in the SC.

Support. ANPCyT, CONICET, UBA

Efeito do glaucoma experimental sobre a arquitetura glial do colículo superior

Objetivos. O glaucoma é uma disfunção ocular prevalente caracterizada pela perda progressiva das funções visuais, a morte de células ganglionares retinianas (CGR) e degeneração axonal. Embora o glaucoma tenha sido concebido como uma doença limitada ao olho, os axônios das RGC são extraoculares, com componentes intraorbitais e intracranianos. Temos desenvolvido um modelo de glaucoma experimental através da injeção semanal intra-cameral de sulfato de condroitina (CSU) que reproduz aspectos centrais do glaucoma humano. O objetivo deste trabalho foi analisar o efeito da hipertensão ocular crônica sobre a estrutura axoglial do CS, a principal área de projeção retiniana no rato.

Métodos. Semanalmente foi injetado CSU (40%) ou veículo na câmara anterior do olho. Foi analisado o fluxo de informação retinocolicular, a função da via visual e a arquitetura astro e microglial do CS (por imunohistoquímica de iba-1 e proteína gliofibrilar ácida [GFAP]).

Resultados. A partir das seis semanas de injeção de CSU diminuiu significativa e progressivamente o transporte anterógrado da subunidade β da toxina da cólera ao CS. Observou-se uma queda significativa na amplitude do componente N2-P2 dos potenciais visuais evocados a partir das seis semanas de hipertensão que progrediu em períodos posteriores. Do mesmo modo, após seis semanas de hipertensão ocular observou-se au-

mento significativo na imunorreatividade para a proteína microglial iba-1 e no número de células microgliais iba-1 positivas, enquanto após 15 semanas observou-se uma marcada resposta astrogliial (GFAP) no CS contralateral ao olho hipertenso.

Conclusões. Estes resultados sugerem uma “desconexão” funcional entre a retina e as vias visuais superiores em etapas precoces de hipertensão ocular (quando ainda o número de CGR permanece inalterado), acompañada de alterações microgliais precoces e astrogliais mais tardias no CS.

Subsídios. ANPCyT, CONICET, UBA.

Modelado y simulación del funcionamiento de válvulas para el drenaje de humor acuoso implantadas en pacientes con glaucoma

Sassetti FL^a, Guarnieri FA^{a,b}, Garelli L^b

^aLaboratorio de Biomems, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Entre Ríos, Oro Verde (Entre Ríos).

^bCentro Internacional de Métodos Computacionales en Ingeniería (CIMEC), INTEC-CONICET, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe.

Objetivo principal. Predecir la variación de la presión intraocular en ojos con glaucomas valvulados.

Objetivos parciales. a) Construir un modelo analítico para predecir los cambios en la presión intraocular en ojos con glaucomas valvulados. b) Obtener la relación presión-caudal para válvulas de Ahmed a partir de estudios experimentales. c) Simular el comportamiento hidrodinámico de las válvulas de Ahmed. d) Describir el mecanismo de control de una válvula activa para la regulación efectiva de la presión intraocular en pacientes con glaucoma.

Métodos. Se construyó un modelo analítico basado en ecuaciones diferenciales que describen el comportamiento hidrodinámico del ojo. La relación entre la presión intraocular y el volumen de humor acuoso se obtuvo en base a datos experimentales. Se implementó el modelo en el *software* Matlab. Se incluyó la válvula en el modelo como un drenaje alternativo entre la

cámara anterior y el circuito venoso periférico. La relación entre la presión y el caudal se obtuvo de trabajos experimentales o de simulaciones numéricas resueltas por métodos computacionales. Para obtener la relación presión-caudal de la válvula de Ahmed se utilizó la técnica *gravity test* (FDA). Para determinar la eficacia y describir el funcionamiento de las válvulas de Ahmed se utilizaron parámetros característicos de ojos con glaucoma. También se describe y se simula el mecanismo de control para una válvula activa construida en base a polímeros conductores biocompatibles para la regulación de la presión intraocular.

Resultados. Se presenta un modelo que permite predecir el comportamiento hidrodinámico del sistema ojo-válvula en base a parámetros característicos del paciente y del dispositivo para el drenaje de humor acuoso. Se caracterizó experimentalmente una válvula de Ahmed mediante una función que relaciona la variación de la presión intraocular con el caudal para luego ser incluida en el modelo.

Conclusiones. El modelo del sistema ojo-válvula permite estudiar el comportamiento dinámico de la presión para diferentes condiciones de funcionamiento. Su uso ayuda a seleccionar el dispositivo más conveniente para cada paciente y facilita la evaluación de dispositivos activos en pacientes con glaucoma.

Agradecimientos. CONICET-INTEC-UNL

Modeling and simulation of valvular function in glaucoma drainage devices

Primary objectives. To predict intraocular pressure variation in eyes with valved glaucomas.

Partial objectives. a) To build an analytical model in order to predict intraocular pressure changes in eyes with valved glaucomas. b) To obtain the pressure-flow relation for Ahmed valves based on experimental studies. c) To simulate the hydrodynamic behavior of Ahmed valves. d) To describe the control mechanism of an active valve for effective intraocular pressure regulation in glaucoma patients.

Methods. An analytical model was built on the basis of differential equations that describe the hydrodynamic behavior of the eye. The relationship between intraocular pressure and aqueous humor volume was obtained on the basis of experimental data. The model was implemented in the software Matlab. The valve

was included in the model as an alternative drainage between the anterior chamber and the peripheral venous circuit. The relationship between pressure and flow was obtained from experimental papers or from numerical simulations solved with the use of computerized methods. The gravity test (FDA) was used to obtain the pressure-flow relationship of the Ahmed valve. Typical parameters of glaucoma eyes were used to determine the efficacy and to describe the functioning of Ahmed valves. We also describe and simulate the control mechanism of an active valve built on the basis of biocompatible conductive polymers for the regulation of intraocular pressure.

Results. We hereby present a model capable of predicting the hydrodynamic behavior of the eye-valve system based on characteristic parameters of the patient and of the device for aqueous humor drainage. An Ahmed valve was experimentally characterized by means of a function relating intraocular pressure with flow, which was subsequently included in the model.

Conclusions. The eye-valve system model enables to study the dynamic behavior of pressure for different functioning conditions. Its use helps select the most convenient device for each patient and facilitates the evaluation of active devices in glaucoma patients.

Acknowledgments. CONICET-INTEC-UNL.

Modelagem e simulação do funcionamento de válvulas para a drenagem de humor aquoso implantadas em pacientes com glaucoma

Objetivo principal. Predizer a variação da pressão intraocular em olhos com glaucomas valvulados.

Objetivos parciais. a) Construir um modelo analítico para prever as alterações na pressão intraocular em olhos com glaucomas valvulados. b) Obter a relação pressão-caudal para válvulas de Ahmed a partir de estudos experimentais. c) Simular o comportamento hidrodinâmico das válvulas de Ahmed. d) Descrever o mecanismo de controle de uma válvula ativa para a regulação efetiva da pressão intraocular em pacientes com glaucoma.

Métodos. Foi construído um modelo analítico baseado em equações diferenciais que descrevem o comportamento hidrodinâmico do olho. A relação entre a pressão intraocular e o volume de humor aquoso foi obtida com base em dados experimentais. Implementou-se

o modelo no *software* Matlab. Foi incluída a válvula no modelo como drenagem alternativa entre a câmara anterior e o circuito venoso periférico. A relação entre a pressão e o caudal foi obtida de trabalhos experimentais ou de simulações numéricas resolvidas por métodos computacionais. Para obter a relação pressão-caudal da válvula de Ahmed foi utilizada a técnica *gravitytest* (FDA). Para determinar a eficácia e descrever o funcionamento das válvulas de Ahmed utilizaram-se parâmetros característicos de olhos com glaucoma. Também é feita a descrição e simulação do mecanismo de controle para uma válvula ativa construída com base em polímeros condutores biocompatíveis para a regulação da pressão intraocular.

Resultados. Apresenta-se um modelo que permite prever o comportamento hidrodinâmico do sistema olho-válvula com base em parâmetros característicos do paciente e do dispositivo para a drenagem de humor aquoso. Uma válvula de Ahmed foi caracterizada experimentalmente mediante uma função que relaciona a variação da pressão intraocular com o caudal para depois ser incluída no modelo.

Conclusões. O modelo do sistema olho-válvula permite estudar o comportamento dinâmico da pressão para diferentes condições de funcionamento. Seu uso ajuda a selecionar o dispositivo mais conveniente para cada paciente e facilita a avaliação de dispositivos ativos em pacientes com glaucoma.

Agradecimentos. CONICET-INTEC-UNL

Detección de queratocono subclínico en base al análisis de los índices del tomógrafo Scheimpflug Pentacam

Ruiseñor Vázquez PR^{a,b}, Delrivo M^b, Garibotto M^b, Fuentes Bonthoux F^{a,b}, Pfortner T^b, Chiaradía PA^a, Galletti JG^{a,b}

^aDivisión Oftalmología, Hospital de Clínicas, Universidad de Buenos Aires.

^bLaboratorio ECOS (Estudios Clínicos Oculares), Buenos Aires. pablo_04@hotmail.com

Objetivos. Evaluar el rendimiento diagnóstico de los índices corneales que provee el dispositivo Pentacam para la detección de queratocono subclínico.

Métodos. Análisis retrospectivo de 136 ojos sanos y 42 ojos con queratocono unilateral por biomicroscopía y topografía corneal, de los cuales se incluyó solo el ojo no afectado. Se les realizó tomografía Scheimpflug y topografía corneal, recopilando —entre otros datos— los índices D de Belin-Ambrosio.

Para el análisis de los datos se utilizó la comparación entre medias (t de Student) y las curvas de características operativas del receptor (ROC). El criterio de significancia estadística utilizado fue $p < 0,05$.

Resultados. No se observó diferencia en la edad (sanos vs queratoconos, $31,0 \pm 8,4$ vs $32,5 \pm 11,4$ años) pero sí en el sexo (42% vs 67% de hombres, $p < 0,01$). Las córneas con queratocono fueron más delgadas (535 ± 30 vs 512 ± 77 μm , $p < 0,01$), de poder corneal promedio similar ($44,26 \pm 1,50$ vs $44,40 \pm 1,96$ D) y con más aberraciones de alto orden ($0,24 \pm 0,07$ vs $0,66 \pm 0,35$ μm $p < 0,0001$). El área bajo la curva ROC, la sensibilidad y la especificidad de los índices D fueron Df = 0,80, 57,1% y 89,0%; Db = 0,83, 52,4% y 99,3%, Dp = 0,92, 64,3% y 97,8%, Dt = 0,79, 42,9% y 94,9%, Dy = 0,80, 54,8% y 90,4%, D = 0,93, 73,8% y 98,5%. Entre los falsos negativos (n=11) y los verdaderos positivos (n=31) del índice D no hubo diferencias en la edad ($28,0 \pm 6,8$ vs $34,0 \pm 12,4$ años), ni en el espesor corneal central (509 ± 40 vs 514 ± 88 μm) ni en el poder corneal promedio ($44,34 \pm 1,44$ vs $44,42 \pm 2,13$ D), pero sí en las aberraciones de alto orden ($0,35 \pm 0,19$ vs $0,76 \pm 0,33$ μm , $p < 0,001$).

Conclusión. El examen de los datos de la cara posterior corneal no parece ser clínicamente superior a los de

la cara anterior en cuanto a sensibilidad, pero sí otorga mayor especificidad, a diferencia de la progresión paquimétrica (Dp) o el índice D, que muestran más sensibilidad y especificidad. El análisis de los falsos negativos del mejor índice muestra menos cambios en la cara anterior que los verdaderos positivos, sugiriendo que los primeros corresponderían a estadios más tempranos en la evolución ectásica. Estos datos sobreestiman probablemente la capacidad diagnóstica del dispositivo por los exigentes criterios de inclusión utilizados. Si bien la tasa de detección es buena, queda un margen importante para combinar esta tecnología con otros métodos de diagnóstico y así mejorar el rendimiento.

Subclinical keratoconus detection based on the analysis of Pentacam Scheimpflug tomography indices

Objectives. To evaluate the diagnostic performance of corneal indices obtained with the Pentacam device for the detection of subclinical keratoconus.

Methods. Retrospective analysis of 136 healthy eyes and 42 eyes with unilateral keratoconus by biomicroscopy and corneal topography; only the unaffected eye was included. These eyes underwent Scheimpflug tomography and corneal topography, with collection of Belin-Ambrosio D indices, among others.

Comparison between mean values (Student-t test) and receiver operating characteristic (ROC) curves were used for data analysis. The level of statistical significance considered was $p < 0.05$.

Results. There was no difference in age (healthy vs. keratoconuses, 31.0 ± 8.4 vs. 32.5 ± 11.4 years) but there was in terms of gender (42% vs. 67% of men, $p < 0.01$). Corneas with keratoconus were thinner (535 ± 30 vs. 512 ± 77 μm , $p < 0.01$), of similar average corneal power (44.26 ± 1.50 vs. 44.40 ± 1.96 D) and with more high order aberrations (0.24 ± 0.07 vs. 0.66 ± 0.35 μm $p < 0.0001$). The area under the ROC curve, sensitivity and specificity of D indices were: Df = 0.80, 57.1% and 89.0%, Db = 0.83, 52.4% and 99.3%, Dp = 0.92, 64.3% and 97.8%, Dt = 0.79, 42.9% and 94.9%, Dy = 0.80, 54.8% and 90.4%, D = 0.93, 73.8% and 98.5%. Between false negatives (n = 11) and true positives (n = 31) of the D index there were no differences in age (28.0 ± 6.8 vs. 34.0 ± 12.4 years), central corneal thickness (509 ± 40 vs. 514 ± 88 μm) and average corneal

power ($44,34 \pm 1,44$ vs. $44,42 \pm 2,13$ D), but there were differences in high order aberrations ($0,35 \pm 0,19$ vs. $0,76 \pm 0,33$ μm , $p < 0,001$).

Conclusion. According to data from the posterior corneal surface there seems to be no clinically superiority over those of the anterior surface regarding sensitivity, but the former provide more specificity, unlike pachymetric progression (Dp) or the D index, which evidence greater sensitivity and specificity. Analysis of false negatives of the best index shows fewer changes in the anterior chamber than true positives, thus suggesting that the former would correspond to earlier stages in the evolution of ectasia. These data may overestimate the diagnostic capacity of the device due to the stringent inclusion criteria used. Though the detection rate is good, plenty of further investigation is needed to combine this technology with other diagnostic methods and thereby improve performance.

Detecção de ceratocone subclínico com base na análise dos índices do tomógrafo Scheimpflug Pentacam

Objetivos. Avaliar o rendimento diagnóstico dos índices corneanos fornecidos pelo dispositivo Pentacam para a detecção de ceratocone subclínico.

Métodos. Análise retrospectiva de 136 olhos são e 42 olhos com ceratocone unilateral por biomicroscopia e topografia corneana, dos quais foi incluído apenas o olho não afetado. Neles foi feita tomografia Scheimpflug e topografia corneana, compilando —entre outros dados— os índices D de Belin-Ambrosio.

Para a análise dos dados foi utilizada a comparação entre médias (t de Student) e as curvas de características operacionais do receptor (ROC). O critério de significância estatística utilizado foi $p < 0,05$.

Resultados. Não se observou diferença na idade (sãos vs. ceratocones, $31,0 \pm 8,4$ vs $32,5 \pm 11,4$ anos) mas sim no sexo (42% vs 67% de homens, $p < 0,01$). As córneas com ceratocone foram mais finas (535 ± 30 vs 512 ± 77 μm , $p < 0,01$), de poder corneano médio semelhante ($44,26 \pm 1,50$ vs $44,40 \pm 1,96$ D) e com mais aberrações de alta ordem ($0,24 \pm 0,07$ vs $0,66 \pm 0,35$ μm $p < 0,0001$). A área sob a curva ROC, a sensibilidade e a especificidade dos índices D foram Df = 0,80, 57,1% e 89,0%; Db = 0,83, 52,4% e 99,3%, Dp = 0,92, 64,3% e 97,8%, Dt = 0,79, 42,9% e 94,9%, Dy

= 0,80, 54,8% e 90,4%, D = 0,93, 73,8% e 98,5%. Entre os falsos negativos (n=11) e os verdadeiros positivos (n=31) do índice D não houve diferenças na idade ($28,0 \pm 6,8$ vs $34,0 \pm 12,4$ anos), nem na espessura corneana central (509 ± 40 vs 514 ± 88 μm) nem no poder corneano médio ($44,34 \pm 1,44$ vs $44,42 \pm 2,13$ D), mas sim houve nas aberrações de alta ordem ($0,35 \pm 0,19$ vs $0,76 \pm 0,33$ μm , $p < 0,001$).

Conclusão. O exame dos dados da face posterior corneana não parece ser clinicamente superior aos da face anterior quanto à sensibilidade, mas proporciona maior especificidade, diferentemente da progressão paquimétrica (Dp) ou do índice D, que mostram maior sensibilidade e especificidade. A análise dos falsos negativos do melhor índice mostra menos alterações na face anterior do que os verdadeiros positivos, sugerindo que os primeiros corresponderiam a estágios precoces na evolução ectásica. Esses dados superestimam provavelmente a capacidade diagnóstica do dispositivo pelos exigentes critérios de inclusão utilizados. Embora a taxa de detecção seja boa, deixa uma margem importante para combinar essa tecnologia com outros métodos de diagnóstico que permitam melhorar o rendimento.

Efecto de PF-MC, inhibidor del factor nuclear KAPPA B, en dos modelos diferentes de inflamación en ratas

Salica JP^{a,b}, Chuluyan E^c, Guerrieri D^c, Mancini J^{a,b}, Gallo JE^{a,b}

^aNanomedicine and Ophthalmology Research Group.

^bServicio de Oftalmología, Universidad Austral, Pilar (Buenos Aires).

^cCátedra de Farmacología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad de Buenos Aires. jp.salica@gmail.com

Objetivo. Evaluar el efecto de PF-MC (proteína de fusión de SLPI-Cementoín) en dos modelos de inflamación en ratas.

Métodos. En el modelo de ratas A se realizó una lesión con álcalis en la córnea derecha de 24 ratas bajo anestesia general, utilizando papel de filtro de 3 mm conteniendo 1 mol/L NaOH durante 40 segundos. Se administró tópicamente SLPI (20 µg), PF-MC (2 µg) y vehículo cuatro veces al día a dos grupos de seis ratas durante 7 días. El cuarto grupo, formado por ojos no lesionados. Los animales fueron sacrificados en el día 1, 3 y 7. El número PMN, la cantidad de células en el estroma corneal y la extensión y la profundidad de vasos fueron examinados histológicamente.

En el modelo B, a seis ratas se le inyectó estreptozotocina en peritoneo. Animales con glucemia > 200 mg/dl fueron incluidos en el estudio. Luego de 12 semanas de diabetes, se inyectó en vítreo PF-MC (20 µg/4 ul). El ojo derecho se utilizó como control. Un mes después del tratamiento, los animales se sacrificaron, las retinas se procesaron para estudio inmunohistoquímico y *western blot*, usando anticuerpos primarios contra TNF-alfa, IL-17, c-PLA2 y GFAP.

Resultados. El número total de células en el estroma corneal y la presencia de macrófagos como la extensión de neovasos disminuyeron en las córneas tratadas con PF-MC comparadas con otros grupos animales ($p < 0.05$). Existió una relación directa entre la severidad de la inflamación y la profundidad de la neovascularización corneal. Se encontró una disminución de inmunorreactividad para TNF-alfa, IL-17 c-PLA2 y GFAP.

Conclusiones. PF-MC demostró efecto antiinflamatorio y antiangiogénico hasta los 7 días de tratamien-

to. Demostró disminución de inmunorreactividad a TNF-alfa, IL-17 c-PLA2 y GFAP en ratas diabéticas. Se debe continuar investigando para determinar el beneficio de utilizar este agente en oftalmología.

Effect of FP-MC, a nuclear factor KAPPA B inhibitor, in two different rat models of inflammation

Objective. To evaluate the effect of FP-MC (fusion protein Cementoin-SLPI) in two rat inflammation models.

Methods. In an A rat model, an alkali injury was produced on the right cornea of 24 rats under general anesthesia, using a 3-mm-diameter filter paper containing 1 mol/L NaOH for 40 seconds. A group of six rats was administered topical SLPI (20 µg), FP-MC (2 µg) and vehicle q.i.d., each for 7 days. The fourth group comprised unaffected eyes. Rats were sacrificed on days 1, 3 and 7. The number of PMN and of cells in the corneal stroma, and extension and depth of neovessels were examined histologically. In model B, six rats underwent peritoneal injection of streptozotocin. Animals with glucose levels > 200 mg/dl were included in the study. After 12 weeks of diabetes induction, FP-MC (20 µg/4 ul) was injected into the vitreous. The right eye was used as control. One month after treatment, rats were sacrificed and retinas were processed for their analysis by immunohistochemistry and western blot with the use of primary antibodies against TNF-alpha, IL-17, c-PLA2 and GFAP.

Results. The total number of cells in the corneal stroma and the presence of macrophages, as well as the extension of neovessels, decreased in the corneas treated with FP-MC vs. other groups of animals ($p < 0.05$). There was a direct relationship between the severity of inflammation and depth of corneal neovascularization. Decreased TNF-alpha-, IL-17-, c-PLA2- and GFAP immunoreactivity was observed.

Conclusions. FP-MC evidenced an anti-inflammatory and antiangiogenic effect up to day 7 of treatment as well as the ability to reduce immunoreactivity to TNF-alpha, IL-17, c-PLA2 and GFAP in diabetic rats. Further investigation is needed to determine the benefit of using this agent in ophthalmology.

Efeito de PF-MC, inibidor do fator nuclear KAPPA B, em dois modelos diferentes de inflamação em ratos

Objetivo. Avaliar o efeito de PF-MC (proteína de fusão de SLPI-Cementoin) em dois modelos de inflamação em ratos.

Métodos. No modelo de ratos A foi realizada uma lesão com álcalis na córnea direita de 24 ratos sob anestesia geral, utilizando papel filtro de três mm contendo 1 mol/L NaOH durante 40 segundos. Administrou-se por via tópica SLPI (20 µg), PF-MC (2µg) e veículo quatro vezes no dia a dos grupos de seis ratos durante sete dias. O quarto grupo, formado por olhos não lesionados. Os animais foram sacrificados no dia 1, 3 e 7. O número PMN, a quantidade de células no estroma corneano e a extensão e profundidade dos vasos foram examinados histologicamente.

No modelo B, seis ratos foram injetados com estreptozotocina no peritônio. Animais com glicemia > 200 mg/dl foram incluídos no estudo. Após 12 semanas de diabetes, injetou-se em vítreo PF-MC (20µg/4 ul). O olho direito foi utilizado como controle. Um mês depois do tratamento, os animais foram sacrificados, as retinas processadas para estudo imunohistoquímico e *western blot*, usando anticorpos primários contra TNF-alfa, IL-17, c-PLA2 e GFAP.

Resultados. O número total de células no estroma corneano e a presença de macrófagos como a extensão dos neovasos diminuíram nas córneas tratadas com PF-MC comparadas com outros grupos animais ($p < 0.05$). Houve uma relação direta entre a severidade da inflamação e a profundidade da neovascularização corneana. Observou-se diminuição de imunorreatividade para TNF-alfa, IL-17 c-PLA2 e GFAP.

Conclusões. PF-MC demonstrou efeito anti-inflamatório e antiangiogênico até os sete dias de tratamento. Demonstrou diminuição de imunorreatividade a TNF-alfa, IL-17 c-PLA2 e GFAP em ratos diabéticos. É preciso continuar pesquisando para determinar o benefício de utilizar esse agente em oftalmologia.

Vías de señalización involucradas en la respuesta inflamatoria inducida por el lipopolisacárido bacteriano en las células del epitelio pigmentario de la retina

Mateos MV, Giusto NM, Salvador GA

Instituto de investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca (INIBI-BB-CONICET), Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca.
mvmateos@criba.edu.ar

Objetivos. Los procesos inflamatorios participan en diversas enfermedades degenerativas e infecciosas de la retina provocando la pérdida parcial o total de la viabilidad de distintos tipos celulares con el consecuente deterioro de la visión. En este sentido se demostró que el lipopolisacárido (LPS) bacteriano puede estimular directamente las células del epitelio pigmentario de la retina (EPR) desencadenando señales inflamatorias y apoptóticas. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la presencia de las isoformas de la fosfolipasa D (PLD1 y PLD 2) en las células del EPR y su participación en los eventos de señalización desencadenados en un modelo de inflamación inducido por LPS.

Métodos. Se utilizó la línea celular humana de EPR ARPE-19. Como modelo de inflamación las células se trataron con LPS (5, 10 y 100 µg/ml) por 24, 48 y 72 horas. La viabilidad celular se evaluó midiendo la reducción del reactivo MTT a cristales de formazán y se realizaron ensayos de *western blot* (WB) para determinar la presencia de las enzimas y la activación de la MAP quinasa ERK1/2 y de la proteína quinasa C (PKC) α/β II.

Resultados. Luego de 48 y 72 horas de tratamiento con 5, 10 y 100 µg/ml de LPS, la viabilidad celular se redujo un 10, 15 y 21% respectivamente. Los ensayos de WB demostraron la presencia de ambas isoformas de PLD (PLD1 y PLD2) en las células ARPE-19 y la activación de ERK1/2 luego de 24 horas de tratamiento con 5, 10 y 100 µg/ml de LPS. Asimismo, PKC α/β II se activó luego de 24 horas de tratamiento con LPS 10 y 100 µg/ml. La preincubación de las células con el inhibidor de PLD2 (APV 0.5 µM) redujo significativamente la activación de ERK1/2 inducida por el tratamiento de LPS (10 µg/ml). Además, tanto APV

como el inhibidor de la vía MEK/ ERK1/2 (U0126 10 μM) restituyeron la viabilidad celular a los niveles observados en la condición control luego de 48 horas de tratamiento con LPS. Por el contrario, el inhibidor de PLD1 (EVJ 0.15 μM) no fue capaz de contrarrestar los efectos producidos por el LPS.

Conclusiones. Los resultados demuestran la presencia de ambas isoformas de PLD y la activación inducida por LPS de ERK1/2 y PKC α/β II en las células ARPE-19. Nuestros hallazgos sugieren que tanto PLD2 como ERK1/2 medirían el daño de las células del EPR en condiciones de inflamación.

Signaling pathways involved in the inflammatory response induced by the bacterial lipopolysaccharide in retinal pigment epithelium cells

Objectives. Inflammatory processes are involved in several degenerative and infectious retinal diseases, thus causing partial or total loss of the viability of different cell types, with the consequent visual impairment. In this regard, it was demonstrated that the bacterial lipopolysaccharide (LPS) can directly stimulate retinal pigment epithelium (RPE) cells and thus trigger inflammatory and apoptotic signals. The goal of this paper was to study the presence of phospholipase D isoforms (PLD1 and PLD2) in RPE cells and their role in the signaling events occurring in a LPS-induced inflammation model.

Methods. Human RPE cell line ARPE-19 was used. As an inflammation model, cells were treated with LPS (5, 10 and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 24, 48 and 72 hours. Cell viability was assessed by measuring MTT reduction to formazan crystals, and western blot (WB) assays were used to determine the presence of the enzymes and ERK1/2 MAP kinase and protein kinase C (PKC) α/β II activation.

Results. After 48 and 72 hours of treatment with 5, 10 and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of LPS, cell viability decreased by 10, 15 and 21%, respectively. WB assays evidenced the presence of both PLD isoforms (PLD1 and PLD2) in ARPE-19 cells, and ERK1/2 activation 24 hours after treatment with 5, 10 and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of LPS. Moreover, PKC α/β II was activated 14 hours after treatment with 5, 10 and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of LPS. Cell preincubation with the PLD2 inhibitor (APV 0.5 μM) significantly

reduced ERK1/2 activation induced by treatment with LPS (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$). In addition, both APV and the MEK/ERK1/2 pathway inhibitor (U0126 10 μM) restored cell viability at the levels observed in the control condition 48 hours after treatment with LPS. Conversely, the PLD1 inhibitor (EVJ 0.15 μM) was unable to counteract the effects of LPS.

Conclusions. The results evidence the presence of both PLD isoforms as well as LPS-induced ERK1/2 and PKC α/β II activation in ARPE-19 cells. Our findings suggest that both PLD2 and ERK1/2 might measure damage to RPE cells under inflammation conditions.

Vias de sinalização envolvidas na resposta inflamatória induzida pelo lipopolissacarídeo bacteriano nas células do epitélio pigmentar da retina

Objetivos. Os processos inflamatórios participam em diversas doenças degenerativas e infecciosas da retina provocando a perda parcial ou total da viabilidade de diferentes tipos celulares com o consequente deterioro da visão. Nesse sentido foi demonstrado que o lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano pode estimular diretamente as células do epitélio pigmentar da retina (EPR) desencadeando sinais inflamatórios e apoptóticos. O objetivo do presente trabalho foi estudar a presença das isoformas da fosfolipase D (PLD1 e PLD 2) nas células do EPR e sua participação nas ocorrências de sinalização desencadeadas em um modelo de inflamação induzido por LPS.

Métodos. Foi utilizada a linha celular humana de EPR ARPE-19. Como modelo de inflamação as células foram tratadas com LPS (5, 10 e 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) por 24, 48 e 72 horas. A viabilidade celular foi avaliada medindo a redução do reagente MTT a cristais de formazan e foram realizados ensaios de *western blot* (WB) para determinar a presença das enzimas e a ativação da MAP quinase ERK1/2 e da proteína quinase C (PKC) α/β II.

Resultados. Após 48 e 72 horas de tratamento com 5, 10 e 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de LPS, a viabilidade celular foi reduzida em 10, 15 e 21% respectivamente. Os ensaios de WB demonstraram a presença de ambas as isoformas de PLD (PLD1 e PLD2) nas células ARPE-19 e a ativação de ERK1/2 após 24 horas de tratamento com 5, 10 e 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de LPS. A PKC α/β II também ativou-se

após 24 horas de tratamento com LPS 10 e 100 µg/ml. A pré-incubação das células com o inibidor de PLD2 (APV 0.5 µM) reduziu significativamente a ativação de ERK1/2 induzida pelo tratamento de LPS (10 µg/ml). Além disso, tanto o APV quanto o inibidor da via MEK/ ERK1/2 (U0126 10 µM) restituíram a viabilidade celular aos níveis observados na condição controle após 48 horas de tratamento com LPS. Pelo contrário, o inibidor de PLD1 (EVJ 0.15 µM) não foi capaz de neutralizar os efeitos produzidos pelos LPS.

Conclusões. Os resultados demonstram presença de ambas as isoformas de PLD e ativação induzida por LPS de ERK1/2 e PKC α/β ll nas células ARPE-19. Nossos achados sugerem que tanto a PLD2 quanto a ERK1/2 mediriam o dano das células do EPR em condições de inflamação.

Las partículas de diesel inducen selectivamente la producción de citoquinas pro-inflamatorias y mucinas en líneas celulares humanas de córnea y conjuntiva

Tau J^a, Novaes P^b, Matsuda M^b, Saldiva P^c, Berra A^a

^aLaboratorio de Investigaciones Oculares, Departamento de Patología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

^bLaboratorio de Investigación em Oftalmologia, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

^cLaboratório de Poluição Atmosférica Experimental, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

julia_tau@hotmail.com

Objetivo. Evaluar el efecto de *diesel exhaust particles* (DEP) a distintas concentraciones (10, 50, 100 y 500 µg/ml) sobre la viabilidad, muerte celular, secreción de citoquinas (IL-6, IL-8 y TNF- α) y producción de mucinas (MUC1, MUC5AC y MUC16) en líneas celulares epiteliales humanas de córnea (HCLE) y conjuntiva (IOBA-NHC).

Métodos. Se realizó conteo celular con azul de tripano 4% para el ensayo de viabilidad. La muerte celular por apoptosis se evaluó por citometría de flujo con kit de anexina-V conjugada a FITC e yoduro de popideo. La

determinación de citoquinas pro-inflamatorias se hizo con kit de ELISA. Por último, los niveles de expresión de mucinas se cuantificaron por Real Time PCR utilizando el equipo Rotor Gene.

Resultados. En las células HCLE expuestas a DEP, al comparar con las mismas creciendo en condiciones estándar, se obtuvo: una disminución dosis dependiente en la viabilidad ($p < 0,001$), no hubo cambio en los niveles de apoptosis, un aumento de IL-6 para todas las concentraciones de DEP ($p < 0,05$), disminución de IL-8 dosis dependiente ($p < 0,001$), disminución de la expresión de MUC1 y MUC16 ($p < 0,05$) para DEP 10 y 100 µg/ml, y disminución en la expresión de MUC5AC ($p < 0,05$) sólo para DEP 100 µg/ml. En las células IOBA-NHC expuestas a DEP, al comparar con las mismas creciendo en condiciones estándar, se obtuvo: una disminución dosis dependiente en la viabilidad ($p < 0,001$), aumento en los niveles de apoptosis para DEP 100 µg/ml ($p < 0,050$), un aumento dosis dependiente en la liberación de IL-6 ($p = 0,014$ para DEP 500 µg/ml), una disminución dosis dependiente en la liberación de IL-8 ($p < 0,05$ para DEP 100 y 500 µg/ml), aumento de la expresión de MUC1, MUC5AC y MUC16 ($p < 0,05$). No se detectó liberación de TNF- α ni en córnea ni en conjuntiva.

Conclusiones. DEP tiene un efecto dosis dependiente en disminuir la viabilidad y la secreción de IL-8 y aumentar la secreción de IL-6, tanto en las células de córnea como de conjuntiva. En cambio, DEP no tuvo efecto en la secreción de TNF- α . Por último, en las células de conjuntiva humana DEP estaría aumentando los niveles de apoptosis y estimulando la producción de mucinas, mientras que en las células de córnea humana estaría inhibiendo la expresión de las mismas mucinas.

Subsidios. PICT2007-02252.

Agradecimiento. Por la ayuda técnica recibida de parte de Graciela Zaccagnini.

Diesel exhaust particles selectively induce both proinflammatory cytokines and mucin production in cornea and conjunctiva human cell lines

Objetivo. To evaluate the effect of diesel exhaust particles (DEP) on the viability, proliferation, apoptosis, secretion of cytokines (IL-6, IL-8, and TNF- α), and mucin gene transcription (MUC1, MUC5AC, and MUC16) in human epithelial cells of the cornea (HCLE) and conjunctiva (IOBA-NHC).

Methods. HCLE and IOBA-NHC cells were incubated with DEP (10-500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 24 hours. Cell proliferation was evaluated by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay. Apoptotic cells were measured by an annexin V-FITC and propidium iodide kit for flow cytometry. Proinflammatory cytokines were determined by an ELISA kit. Mucin gene transcription was quantified by real-time PCR.

Results. DEP significantly decreased the viability, proliferation, and secretion of IL-8, but increased the secretion of IL-6 on both HCLE and IOBA-NHC cell lines in a dose-dependent manner. Neither cornea nor conjunctiva cells incubated with DEP released TNF- α . DEP induced a significant increase in the percentage of apoptotic cells in IOBA-NHC, whereas no changes were observed in HCLE. Finally, DEP significantly decreased the transcription levels of MUC1 and MUC16 in HCLE, but increased the transcription levels of MUC1, MUC5AC, and MUC16 in IOBA-NHC.

Conclusions. These findings suggest that human corneal and conjunctival epithelial cells incubated with DEP showed cytotoxicity and an inflammatory response mediated by IL-6, not by TNF- α or IL-8. Also, the decrease in mucin expression in the cornea cells might leave exposed areas in the cornea for contact with DEP. Finally, the increase in mucin expression in the conjunctiva cells might be involved at least in the clearance of DEP to protect the ocular epithelium.

Acknowledgment. Technical support from Graciela Zaccagnini.

As partículas de diesel induzem seletivamente a produção de citocinas pró-inflamatórias e mucinas nas linhas celulares humanas de córnea e conjuntiva

Objetivo. Avaliar o efeito de *diesel exhaust particles* (DEP) em diferentes concentrações (10, 50, 100 e 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) sobre a viabilidade, morte celular, secreção de citocinas (IL-6, IL-8 e TNF- α) e produção de mucinas (MUC1, MUC5AC e MUC16) em linhas celulares epiteliais humanas de córnea (HCLE) e conjuntiva (IOBA-NHC).

Métodos. Realizou-se contagem celular com azul de tripan 4% para o ensaio de viabilidade. A morte celular por apoptose foi avaliada por citometria de fluxo com kit de anexina-V conjugada ao FITC e iodeto de propídio. A determinação de citocinas pró-inflamatórias foi feita com kit de ELISA. Por último, os níveis de expressão de mucinas foram quantificados por Real Time PCR utilizando o equipamento Rotor Gene.

Resultados. Nas células HCLE expostas a DEP, quando comparadas crescendo em condições padrão, foi obtida: uma diminuição dose-dependente na viabilidade ($p < 0,001$), não houve alterações nos níveis de apoptose, aumento de IL-6 para todas as concentrações de DEP ($p < 0,05$), diminuição de IL-8 dose-dependente ($p < 0,001$), diminuição da expressão de MUC1 e MUC16 ($p < 0,05$) para DEP 10 e 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, e diminuição na expressão de MUC5AC ($p < 0,05$) só para DEP 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Nas células IOBA-NHC expostas ao DEP, quando comparadas crescendo em condições padrão, obteve-se: diminuição dose-dependente na viabilidade ($p < 0,001$), aumento nos níveis de apoptose para DEP 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ($p < 0,050$), aumento-dose dependente na liberação de IL-6 ($p = 0,014$ para DEP 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$), diminuição dose-dependente na liberação de IL-8 ($p < 0,05$ para DEP 100 e 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$), aumento da expressão de MUC1, MUC5AC e MUC16 ($p < 0,05$). Não foi detectada liberação de TNF- α nem em córnea nem em conjuntiva.

Conclusões. ODEP tem efeito dose-dependente na diminuição da viabilidade e da secreção de IL-8 e aumentar a secreção de IL-6, tanto nas células da córnea quanto nas da conjuntiva. Entretanto, a DEP não teve efeito na secreção de TNF- α . Por último, nas células da conjuntiva humana a DEP estaria aumentando os níveis de apoptose e estimulando a produção de mu-

cinas, enquanto nas células da córnea humana estaria inibindo a expressão das mesmas mucinas.

Subsídios. PICT2007-02252.

Agradecimiento. Pela ajuda técnica de Graciela Zaccagnini.

La producción de prostaglandinas en el músculo ciliar del cerdo

Benozzi G, Quinteros Villarruel E, Benozzi J, Borda ES, Orman B

Cátedra de Farmacología, Facultad de Odontología, Universidad de Buenos Aires.

Centro de Investigación Avanzada de la Presbicia (CIAP)

betinaorman@yahoo.com.ar

Objetivo. En este trabajo nosotros evaluamos la capacidad del músculo ciliar del cerdo en la generación de prostaglandina (PGE2) por estimulación colinérgica en presencia y en ausencia de un agonista colinérgico (carbacol) y sus respectivos antagonistas. El músculo ciliar del cerdo (MC) es liso, en forma de anillo, cuyas fibras musculares circulares y longitudinales anatómicamente tienen una disposición que al contraerse provocan un cambio en la forma y la ubicación del cristalino permitiendo la consiguiente acomodación.

Métodos. Mediante la técnica de ELISA valoramos el efecto del carbacol (agonista colinérgico) y los antagonistas colinérgicos de los diferentes subtipos (M1, M2, M3 y M4) como así también de diferentes inhibidores enzimáticos sobre la producción de la PGE2.

Resultados. Se observó que el carbacol a concentraciones crecientes (desde 1×10^{-10} a 1×10^{-6} M) incrementa la producción de PGE2 dependiente de la dosis, alcanzando un efecto máximo a 1×10^{-7} M de carbacol. Por otro lado, el efecto del carbacol fue inhibido en presencia de 1×10^{-6} M de atropina y un inhibidor inespecífico de la ciclooxigenasa, indometacina 8×10^{-4} M. Asimismo, si previo al agregado del carbacol usamos los antagonistas colinérgicos muscarínicos específicos de los diferentes subtipos M1 (1×10^{-6} M pirenzepina), M2 (1×10^{-6} M AF-DX 116), M3 (4.5×10^{-9} M J104129) y M4 (1×10^{-6} M tropicamida) estos

bloquearon el efecto del carbacol sobre la producción de PGE2 tan sólo por los subtipos M3 y M1. Además, en el efecto estimulador del carbacol descrito más arriba, estaría involucrada la movilización del calcio, ya que en presencia de verapamilo 1×10^{-5} (bloqueante del canal L de calcio) se inhibió la acción del carbacol sobre la producción de PGE2; mientras que en presencia de A23187 (ionóforo de calcio) se estimuló la producción de PGE2.

Conclusión. Estos resultados nos permiten concluir que la transducción de señales y de segundos mensajeros vinculados con la capacidad del carbacol de unirse y activar a los receptores muscarínicos colinérgicos del subtipo M1 y M3 estimula la producción de PGE2-Ca⁺⁺ dependiente.

Prostaglandin production in the pig ciliary muscle

Objective. We have evaluated the ability of the pig ciliary muscle to generate prostaglandin E2 (PGE2) by cholinergic stimulation in the presence and absence of a cholinergic agonist (carbacol) and its corresponding antagonists. The pig ciliary muscle (CM) is smooth and ring-shaped, and contraction of its circular and longitudinal muscle fibers, due to their anatomical arrangement, produces a change in the shape and location of the crystalline lens, thus allowing for the consequent accommodation.

Methods. The effect of carbacol (a cholinergic agonist) and cholinergic antagonists of the different subtypes (M1, M2, M3 and M4), as well as of different enzyme inhibitors on PGE2 production was analyzed by ELISA.

Results. Carbacol, at increasing concentrations (from 1×10^{-10} to 1×10^{-6} M) increases dose-dependent PGE2 production, with its maximum effect achieved at 1×10^{-7} M of carbacol. On the other hand, the effect of carbacol was inhibited in the presence of 1×10^{-6} M of atropine and a non-specific cyclooxygenase inhibitor, indomethacin 8×10^{-4} M. Furthermore, if before the addition of carbacol, the specific muscarinic cholinergic antagonists of the different subtypes: M1 (1×10^{-6} M pirenzepine), M2 (1×10^{-6} M AF-DX 116), M3 (4.5×10^{-9} M J104129) and M4 (1×10^{-6} M tropicamide) are used, they block the effect of carbacol on PGE2 production only for sub-

types M2 and M1. In addition, calcium mobilization might be involved in the stimulating effect of carbachol described above, since, in the presence of verapamil 1×10^{-5} (an L-calcium channel blocker) the action of carbachol on PGE2 production was inhibited, while it was stimulated in the presence of A23187 (calcium ionophore).

Conclusion. Based on these results, it may be concluded that transduction of signals and second messengers linked to the ability of carbachol to bind and activate M1- and M3 subtype cholinergic muscarinic receptors stimulates Ca^{++} -dependent PGE2 production.

A produção de prostaglandinas no músculo ciliar do porco

Objetivo. Neste trabalho avaliamos a capacidade do músculo ciliar do porco na geração de prostaglandina (PGE2) por estimulação colinérgica em presença e em ausência de um agonista colinérgico (carbachol) e seus respectivos antagonistas. O músculo ciliar do porco (MC) é liso, em forma de anel, cujas fibras musculares circulares e longitudinais anatomicamente têm uma disposição que ao contrair-se provocam uma alteração na forma e na localização do cristalino, permitindo a conseguinte acomodação.

Métodos. Mediante a técnica de ELISA avaliamos o efeito do carbachol (agonista colinérgico) e os antagonistas colinérgicos dos diferentes subtipos (M1, M2, M3 e M4) bem como dos diferentes inibidores enzimáticos sobre a produção da PGE2.

Resultados. Observou-se que o carbachol em concentrações crescentes (desde 1×10^{-10} até 1×10^{-6} M) incrementa a produção de PGE2 dependente da dose, alcançando um efeito máximo a 1×10^{-7} M de carbachol. Por outro lado, o efeito do carbachol foi inibido em presença de 1×10^{-6} M de atropina e um inibidor inespecífico da ciclo-oxigenase, indometacina 8×10^{-4} M. Do mesmo modo, se antes de acrescentar carbachol usamos os antagonistas colinérgicos muscarínicos específicos dos diferentes subtipos M1 (1×10^{-6} M pirenzepina), M2 (1×10^{-6} M AF-DX 116), M3 (4.5×10^{-9} M J104129) e M4 (1×10^{-6} M tropicamida), eles bloquearam o efeito do carbachol sobre a produção de PGE2 apenas pelos subtipos M3 e M1. Além disso, no efeito estimulatório do carbachol antes

descrito, estaria envolvida a mobilização do cálcio, já que em presença de verapamil 1×10^{-5} (bloqueador do canal L de cálcio) foi inibida a ação do carbachol sobre a produção de PGE2; enquanto em presença de A23187 (ionóforo de cálcio) a produção de PGE2 foi estimulada.

Conclusão. Estes resultados permitem concluir que a transdução de sinais e de segundos mensageiros vinculados com a capacidade do carbachol de unir-se e ativar os receptores muscarínicos colinérgicos do subtipo M1 e M3 estimula a produção de PGE2- Ca^{++} dependente.

Reporte de seguridad y tolerancia en inyecciones intravítreas bilaterales simultáneas en consultorio

Franco PJ, Schlottmann PG

Organización Médica de Investigación (OMI), Buenos Aires.
pablojavierfranco@gmail.com

Objetivo. Evaluar la seguridad y tolerancia de la inyección intravítrea bilateral simultánea en pacientes con patología retinal tratados en nuestro centro.

Diseño. Retrospectivo, serie de casos.

Materiales y métodos. Se revisaron las historias clínicas de los pacientes sometidos a inyecciones bilaterales simultáneas entre el 1º de junio de 2010 y el 30 de septiembre de 2012 en el consultorio de nuestro centro. Se registró el diagnóstico, la cantidad de inyecciones bilaterales, los eventos adversos, las complicaciones y la opinión de los pacientes mediante un cuestionario.

Resultados. Se contabilizaron un total de 80 inyecciones bilaterales simultáneas en 22 pacientes. Veinte pacientes recibieron Lucentis en ambos ojos (total 67 inyecciones) y 2 recibieron Lucentis y aflibercept en el ojo contralateral (total 13 inyecciones). La patología más frecuente fue el edema macular diabético 77% (17 pacientes) y maculopatía exudativa 23% (5 pacientes). No se registraron eventos adversos serios, la complicación más frecuente fue la queratitis. Todos los pacientes entrevistados prefirieron la inyección bilateral simultánea por sobre la diferida, previo a la inyección y luego de recibir el tratamiento.

Conclusión. La inyección bilateral es un procedimiento que, según la evidencia disponible, es seguro. Si bien la muestra es pequeña, los pacientes prefieren la inyección bilateral el mismo día, ya que ahorra tiempo y acelera el tratamiento. Es importante discutir este procedimiento con cada paciente para que pueda decidir cómo prefiere ser tratado.

Safety and tolerability report in in-office simultaneous bilateral intravitreal injections

Objective. To evaluate the safety and tolerability of simultaneous bilateral intravitreal injections in patients with retinal disease treated in our center.

Design. Retrospective, case-series study.

Material and methods. Clinical records of patients who underwent simultaneous bilateral injections between June 1, 2010 and September 30, 2012 in the offices of our center were reviewed. Diagnosis, number of bilateral injections, adverse events, complications and patient opinions were recorded according to the results of a questionnaire.

Results. A total of 80 simultaneous bilateral injections in 20 patients were recorded. Twenty patients received Lucentis in both eyes (67 injections in total) and 2 received Lucentis and aflibercept in the fellow eye (total: 13 injections). The most common disease was diabetic macular edema: 77% (17 patients) and exudative maculopathy: 23% (5 patients). No serious adverse events were reported and the most common complication was keratitis. All patients reported that they preferred simultaneous bilateral injection over the deferred one, before the injection and after receiving treatment.

Conclusion. Bilateral injection is a safe procedure, as far as the evidence available is concerned. Though the sample is small, patients prefer the bilateral injection on the same day, since it is time-saving and accelerates treatment. It is important to discuss this procedure with the patient so that he/she can decide on the treatment preferred.

Relatório de segurança e tolerância em injeções intravítreas bilaterais simultâneas em consultório

Objetivo. Avaliar a segurança e tolerância da injeção intravítrea bilateral simultânea em pacientes com patologia retiniana tratados no nosso centro.

Projeto. Retrospectivo, série de casos.

Materiais e métodos. Foram revisados os prontuários clínicos dos pacientes submetidos a injeções bilaterais simultâneas entre o 1 de junho de 2010 e 30 de setembro de 2012 no consultório do nosso centro. Registraram-se: o diagnóstico, a quantidade de injeções bilaterais, os eventos adversos, as complicações e a opinião dos pacientes mediante um questionário.

Resultados. Foram contabilizadas um total de 80 injeções bilaterais simultâneas em 22 pacientes. Vinte pacientes receberam Lucentis em ambos os olhos (total 67 injeções) e 2 deles receberam Lucentis e aflibercept no olho contralateral (total 13 injeções). A patologia mais frequente foi o edema macular diabético 77% (17 pacientes) e maculopatia exudativa 23% (5 pacientes). Não foram registrados eventos adversos sérios, a complicação mais frequente foi a ceratite. Todos os pacientes entrevistados preferiram a injeção bilateral simultânea acima da diferida, antes e depois de receber o tratamento.

Conclusão. A injeção bilateral é um procedimento seguro segundo a evidência disponível. Embora a mostra seja pequena, os pacientes preferem a injeção bilateral no mesmo dia, já que economiza tempo e acelera o tratamento. É importante discutir esse procedimento com cada paciente para que possa decidir como prefiere ser tratado.

Ranibizumab y bevacizumab en la degeneración macular asociada con la edad (DMAE): ¿la efectividad puede estar condicionada a la accesibilidad al tratamiento?

Real JP, Urrets-Zavalía JA, Luna JD, Juárez CP, Der Ohannesian M, Palma SD, Granero G

Unidad de Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología Farmacéutica (UNITEFA-CONICET), Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba. jpreal@fcq.unc.edu.ar

Objetivo. Evaluar si las diferencias existentes en las vías de acceso a las dosis de ranibizumab (RNB) y bevacizumab (BVZ) producen diferencias en la efectividad clínica de los tratamientos de la degeneración macular asociada con la edad (DMAE).

Metodología. Se realizó un estudio longitudinal retrospectivo valorando la totalidad de casos (96 ojos, 78 pacientes) que, con un diagnóstico confirmado de DMAE y sin antecedentes de tratamientos previos, iniciaron tratamiento con RNB o BVZ en uno de los tres centros seleccionados durante el período comprendido entre enero de 2009 y diciembre de 2011.

Las medidas de resultados principales fueron: los tiempos de retraso de inicio de tratamiento, la agudeza visual (AV) perdida durante dicho tiempo, el número de dosis y los principales resultados clínicos medidos en diferentes tiempos.

Resultados. En ambos grupos de tratamiento se observó una pérdida de AV asociada con el tiempo de retraso, con correlación estadística entre estas variables y una mayor presencia de las mismas que en el grupo tratado con RNB (153.8 vs 36,06 días, $p < 0,0001$), (-13,01 vs -5,46 letras, $p < 0,01$).

Iniciado el tratamiento, pudo observarse en ambos grupos una mejora significativa de la AV tras la fase de carga seguida de una disminución de los controles de seguimiento con caída de la AV. El efecto global del tratamiento fue estadísticamente superior en el grupo tratado con BVZ, tanto si se considera el cambio medio de AV (+0,11 vs -8,87 letras $p = 0,039$) como la proporción de pacientes que perdieron menos de 15 letras (80% vs 56% $p = 0,03$).

Conclusiones. La velocidad de acceso al tratamiento, condicionada por aspectos burocráticos, puede ser un factor clave en el éxito terapéutico de estos tratamientos. En este sentido, el uso *off-label* de BVZ ofrece a los pacientes la opción de obtener mejores resultados, no por ventajas farmacodinámicas sino por la diferencia en el acceso al tratamiento.

Agradecimientos. Centro Privado de Ojos Romagosa-Fundación VER. Departamento de Oftalmología de la Clínica Universitaria Reina Fabiola, Universidad Católica de Córdoba.

Ranibizumab and bevacizumab in exudative age-related macular degeneration: is effectiveness conditioned by therapy accessibility?

Objectives. To evaluate whether the differences in access to treatment with ranibizumab (RNB) and bevacizumab (BVZ) produce differences in the clinical effectiveness of therapies for age-related macular degeneration (ARMD).

Methodology. Retrospective longitudinal study evaluating all treatment-naïve cases (96 eyes, 78 patients) with confirmed diagnosis of ARMD that were started on therapy with RNB or BVZ in one of the three centers selected over a period between January 2009 and December 2011.

The primary outcome measures were: time delay in therapy initiation, visual acuity (VA) lost during the time delay, number of doses and main clinical outcomes evaluated at different time-points.

Results. In both treatment groups there was VA loss associated with time delay, with statistical correlation between these variables, which were present in more cases than in the RNB-treated group (153.8 vs. 36.06 days, $p < 0.0001$), (-13.01 vs. -5.46 letters, $p < 0.01$).

Once therapy was initiated, there was a significant improvement of VA in both groups after the loading phase, followed by a reduction in follow-up visits with AV drop. The global effect of treatment was statistically superior in the group treated with BVZ, both in terms of mean VA change (+0.11 vs. -8.87 letters; $p = 0.039$) and in the proportion of patients who lost less than 15 letters (80% vs. 56% $p = 0.03$).

Conclusions. Time to access to therapy, conditioned by bureaucratic aspects may be a key factor in the

therapeutic success of these treatments. In this regard, off-label use of BVZ provides patients with the potential of better results, not because of pharmacodynamic advantages but rather because of the difference in access to therapy.

Acknowledgment. Centro Privado de Ojos Romagosa-Fundación VER. Departamento de Oftalmología de la Clínica Universitaria Reina Fabiola, Universidad Católica de Córdoba.

Ranibizumab e bevacizumab na degeneração macular associada à idade (DMAI): a efetividade pode estar condicionada à acessibilidade ao tratamento

Objetivo. Avaliar se as diferenças existentes nas vias de acesso às doses de ranibizumab (RNB) e bevacizumab (BVZ) produzem diferenças na efetividade clínica dos tratamentos da degeneração macular associada à idade (DMAI).

Metodologia. Foi realizado um estudo longitudinal retrospectivo avaliando a totalidade de casos (96 olhos, 78 pacientes) que, com um diagnóstico confirmado de DMAI e sem antecedentes de tratamentos prévios, iniciaram tratamento com RNB ou BVZ em um dos três centros selecionados durante o período compreendido entre janeiro de 2009 e dezembro de 2011.

As medidas de resultados principais foram: os tempos de demora de início de tratamento, a agudeza visual (AV) perdida durante esse tempo, o número de doses e os principais resultados clínicos medidos em diferentes momentos.

Resultados. Em ambos os grupos de tratamento foi observada uma perda de AV associada ao tempo de retardo, com correlação estatística entre estas variáveis e maior presença delas que no grupo tratado com RNB (153,8 vs. 36,06 dias, $p < 0,0001$), (-13,01 vs. -5,46 letras, $p < 0,01$).

Iniciado o tratamento, foi observada em ambos os grupos uma melhora significativa da AV depois da fase de carga seguida de uma diminuição dos controles de acompanhamento com queda da AV. O efeito global do tratamento foi estatisticamente superior no grupo tratado com BVZ, tanto se for considerada a alteração média de AV (+0,11 vs -8,87 letras $p = 0,039$) quanto a proporção de pacientes que perderam menos de 15 letras (80% vs 56% $p = 0,03$).

Conclusões. A velocidade de acesso ao tratamento, condicionada por aspectos burocráticos, pode ser um fator chave no sucesso terapêutico desses tratamentos. Nesse sentido, o uso *off-label* de BVZ oferece aos pacientes a opção de obter melhores resultados, não pelas vantagens farmacodinâmicas, mas pela diferença no acesso ao tratamento.

Agradecimentos. Centro Privado de Ojos Romagosa-Fundación VER. Departamento de Oftalmología da Clínica Universitaria Reina Fabiola, Universidade Católica de Córdoba.

Mecanismos involucrados con la ruptura de la tolerancia inmunológica conjuntival por conservantes de colirios

Galleti JG^{a,b}, Gabelloni ML^a, Sabbione F^a, Chiesa I^a, Casiraghi JF^b, Chiaradía PA^b, Giordano MN^a

^aLaboratorio de Inmunología, Instituto de Medicina Experimental (IMEX), Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires.

^bDivisión Oftalmología, Hospital de Clínicas, Universidad de Buenos Aires.

jeremiasg@gmx.net

Objetivos. Evaluar los mecanismos moleculares y celulares responsables del efecto inmune del cloruro de benzalconio (BAK) sobre la superficie ocular.

Métodos. Para el modelo *in vivo*, ratones Balb/c fueron instilados en ambos ojos diariamente por 5 días con ovalbúmina (OVA) sola o con BAK 0,01% (B+O), sin y con inhibidores de la activación del factor nuclear kappa B (NFkB): ditiocarbamato de pirrolidina (PDTC) y sulfasalazina (SSZ). Finalmente los animales fueron inmunizados con OVA y aluminio para medir la respuesta sistémica evaluando la proliferación de los esplenocitos por incorporación de timidina. Para modelar *in vitro* el epitelio de la superficie ocular, se expusieron células Pam212 durante 15 minutos a diferentes concentraciones de BAK (0,00001% a 0,001%) y luego se cultivaron por 96 h con esplenocitos singéneos. Finalmente se evaluó la viabilidad y la expresión de moléculas de histocompatibilidad de clase II (CMH-II) como marcador de activación.

Resultados. En el modelo *in vivo*, la instilación de OVA indujo tolerancia conjuntival ($43 \pm 9\%$ de la respuesta sistémica control), a diferencia de B+O ($90 \pm 8\%$), que no produjo disminución de la respuesta celular posterior. El agregado de los inhibidores restableció la tolerancia ante B+O (PDTC $39 \pm 3\%$, SSZ $54 \pm 8\%$) y no la afectó con OVA sola (PDTC $31 \pm 5\%$, SSZ $69 \pm 5\%$). En los cultivos epiteliales, la exposición a BAK disminuyó la viabilidad de las células Pam212 a las 96 horas pero no modificó significativamente la fracción CMH-II+ (5% basal, <8% con BAK). Tanto el interferón como el cocultivo con esplenocitos singeneicos aumentaron la fracción CMH-II+ de células Pam212 (15% y 19%, respectivamente). Al pretratar las células Pam212 con BAK, el cocultivo incrementó aún más la fracción CMH-II+ (24-46% según la concentración de BAK). El agregado de SSZ no modificó la expresión de CMH-II.

Conclusiones. En este modelo *in vivo*, la ruptura de tolerancia conjuntival inducida por BAK puede revertirse ante la instilación de dos inhibidores conocidos de NFkB. El BAK no parecería mediar directamente la activación epitelial observada en las biopsias conjuntivales de pacientes, sino a través del efecto de la interacción entre las células epiteliales y los linfocitos. Estos resultados sugieren que la modulación de la vía NFkB podría tener un uso terapéutico en la superficie ocular.

Subsidios y agradecimientos. Bioterio del IMEX por la provisión de ratones y la asistencia técnica.

Mechanisms involved in conjunctival immunological tolerance breakdown by eyedrop preservatives

Objectives. To evaluate the molecular and cellular mechanisms responsible for the immune effect of benzalkonium chloride (BAK) on the ocular surface.

Methods. For the *in vivo* model, both eyes of Balb/c mice were daily instilled for five days with ovalbumin (OVA) alone or with BAK 0.01% (B+O), with and without nuclear factor kappa (NFkB) activation inhibitors: pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) and sulfasalazine (SSZ). Then, mice were immunized with OVA and aluminium to measure systemic response by evaluating splenocyte proliferation as measured by thymidine incorporation. Pam212 cells were exposed for 15 minutes to different BAK concentrations (0.00001% to

0.001%) and subsequently cultured for 96 hours with syngeneic splenocytes for *in vitro* modeling of ocular surface epithelium. Finally, the viability and expression of major histocompatibility complex class II (MHC-II) molecules as an activation marker were evaluated.

Results. In the *in vivo* model, OVA instillation induced conjunctival tolerance ($43 \pm 9\%$ of the control systemic response), unlike B+O ($90 \pm 8\%$), which did not produce decrease in the posterior cell response. Addition of inhibitors restored tolerance to B+O (PDTC $39 \pm 3\%$, SSZ $54 \pm 8\%$), which was unaffected by OVA alone (PDTC $31 \pm 5\%$, SSZ $69 \pm 5\%$). In epithelial cultures, exposure to BAK reduced the viability of Pam212 cells after 96 hours but did not significantly change the MHC-II(+) fraction (5% at baseline, < 8% with BAK). Both interferon and the co-culture with syngeneic splenocytes increased the MHC-II(+) fraction of Pam21 cells (15% and 19%, respectively). Pretreatment of Pam212 cells with BAK increased even further the MHC-II(+) fraction (24 – 46% according to the BAK concentration). Addition of SSZ had no influence on MHC-II expression.

Conclusions. In this *in vivo* model, BAK-induced conjunctival immunological tolerance breakdown can be reversed by instillation of two known NFkB inhibitors. BAK does not seem to directly mediate the epithelial activation observed in conjunctival biopsies of patients, but rather through the effect of the interaction between epithelial cells and lymphocytes. These results suggest that modulation of the NFkB pathway might have a therapeutic use in the ocular surface.

Supports and acknowledgments. IMEX vivarium for the supply of mice and technical assistance.

Mecanismos involucrados com a ruptura da tolerância imunológica conjuntival por conservantes de colírios

Objetivos. Avaliar os mecanismos moleculares e celulares responsáveis pelo efeito imune do cloreto de benzalcônio (BAK) sobre a superfície ocular.

Métodos. Para o modelo *in vivo*, ratos Balb/c foram instilados em ambos os olhos diariamente por 5 dias com ovalbumina (OVA) só ou com BAK 0,01% (B+O), sem e com inibidores da ativação do fator nuclear kappa B (NFkB): ditiocarbamato de pirrolidina (PDTC) e sulfasalazina (SSZ). Finalmente os animais

foram imunizados com OVA e alumínio para medir a resposta sistêmica avaliando a proliferação dos esplenócitos por incorporação de timidina. Para modelar *in vitro* o epitélio da superfície ocular, foram expostas células Pam212 durante 15 minutos a diferentes concentrações de BAK (0,00001% a 0,001%) e depois foram cultivadas por 96 h com esplenócitos singênicos. Finalmente foi avaliada a viabilidade e a expressão de moléculas de histocompatibilidade de classe II (CMH-II) como marcador de ativação.

Resultados. No modelo *in vivo*, a instilação de OVA induziu tolerância conjuntival ($43 \pm 9\%$ da resposta sistêmica controle), a diferença de B+O ($90 \pm 8\%$), que não produziu diminuição da resposta celular posterior. O acréscimo dos inibidores restabeleceu a tolerância ante B+O (PDTC $39 \pm 3\%$, SSZ $54 \pm 8\%$) sem afetá-lacom OVA só (PDTC $31 \pm 5\%$, SSZ $69 \pm 5\%$). Nas culturas epiteliais, a exposição a BAK diminui a viabilidade das células Pam212 às 96 horas mas não alterou significativamente a fração CMH-II+ (5% basal, <8% com BAK). Tanto o interferon quanto a co-cultura com esplenócitos singênicos aumentaram a fração CMH-II+ de células Pam212 (15% e 19%, respectivamente). Ao tratar previamente as células Pam212 com BAK, a co-cultura incrementou ainda mais a fração CMH-II+ (24-46% segundo a concentração de BAK). O acréscimo de SSZ não alterou a expressão de CMH-II.

Conclusões. Nesse modelo *in vivo*, a ruptura de tolerância conjuntival induzida por BAK pode ser revertida ante a instilação de dois inibidores conhecidos de NFkB. O BAK não pareceria mediar diretamente a ativação epitelial observada nas biopsias conjuntivais de pacientes, senão através do efeito da interação entre as células epiteliais e os linfócitos. Estes resultados sugerem que a modulação da via NFkB poderia ter um uso terapêutico na superfície ocular.

Subsídios e agradecimentos. Biotério do IMEX pelo fornecimento de ratos e a assistência técnica.

Desgarros sucesivos en el curso de desprendimiento posterior de vítreo

Crim N^a, Monti R^a, Espósito E^a, Correa L^a, Serra HM^b, Urrets Zavalía JA^a

^aServicio de Oftalmología, Clínica Universitaria Reina Fabiola, Universidad Católica de Córdoba. ^bCIBICI-CONICET, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba. nicolas-crim@hotmail.com

Objetivo. Analizar la presentación de desgarros retiniales vitreogénicos sucesivos (DRVS) en pacientes que desarrollaron desgarros retiniales vitreogénicos (DRV) en el curso de desprendimiento posterior de vítreo (DPV) sintomático.

Material y métodos. Estudio retrospectivo de pacientes con DRV en el curso de DPV del Servicio de Oftalmología de la Clínica Universitaria Reina Fabiola desde 1991 hasta la fecha. Se evaluaron 217 ojos en 201 pacientes consecutivos que presentaron uno o más DRV en la evolución del DPV sintomático. Se realizó un examen oftalmológico completo que incluyó oftalmoscopia binocular indirecta con depresión escleral en todos los pacientes realizada por el mismo retinólogo (JUZ). DRVS se definió como DRV posterior al diagnóstico inicial de un DRV.

Resultados. Los pacientes fueron divididos en dos grupos. En el grupo 1, los pacientes no presentaron DRV sucesivos (DRVNS), presentando sólo un único DRV en el examen inicial, no desarrollando nuevos desgarros durante el seguimiento: 195 ojos en 181 pacientes; edad media de $55,7 \pm 15,2$ años ($r= 15-89$); 52.8% mujeres y 47.2% hombres ($p 0,31$); el 22,05% de los ojos tenía antecedentes de DRV o desprendimiento de retina (DR) en ojo contralateral; promedio de RT $1,39 \pm 0,8$ ($r=1-5$); 58.2% eran ojos miopes ($p <0,05$); 54.14% fueron sintomáticos. En el grupo 2, los pacientes desarrollaron DRVS: 22 ojos en 20 pacientes, representando 9,95% del total de 201 pacientes estudiados, con una edad media de $53,3 \pm 3,6$ años ($r= 30-69$); 63.6% hombres y 36.4% mujeres ($p 0,13$); el 45,5% ($p 0,30$) de los ojos tenía antecedentes de DRV o DR en ojo contralateral; promedio de DRV $1,37 \pm 0,5$ ($r=1-2$) por ojo; el 85.7% eran ojos miopes ($p <0,05$); 68.2% fueron sintomáticos ($p 0,07$). El 81,8% de los DRVS

ocurrir dentro de los 120 días posteriores al primer DRV.

Conclusiones. Se pueden diagnosticar múltiples DRV o DRVS en el curso de un DPV. Los DRVS son una forma infrecuente de presentación de los DRV, siendo más frecuentes en miopes. El 81,8% de los DRVS fueron diagnosticados dentro de los 120 días posteriores del primer RT. Si son mal diagnosticados o eventualmente no tratados suponen un aumento de riesgo para el desarrollo de DR.

Subsequent retinal tears in the course of posterior vitreous detachment

Objetivo. To analyze the occurrence of subsequent vitreogenic retinal tears (SVRT) in patients developing vitreogenic retinal tears (VRT) in the course of symptomatic posterior vitreous detachment (PVD).

Material and methods. Retrospective analysis of patients with VRT in the course of PVD of the Ophthalmology Service of “Clínica Universitaria Reina Fabiola” from 1991 to date. A total of 217 eyes from 201 consecutive patients with one or more VRTs in the evolution of symptomatic PVD were evaluated. All patients underwent complete ophthalmologic examination including indirect binocular ophthalmoscopy with scleral depression performed by the same retinologist (JUZ). SVRT was defined as VRT following initial diagnosis of VRT.

Results. Patients were divided into two groups. In group 1, patients evidenced no subsequent VRTs (SVRTs), with a single VRT upon initial examination and not developing new tears during follow-up: 195 eyes of 181 patients, mean age: 55.7 ± 15.2 years ($r=15-89$); 52.8% women and 47.2% men ($p=0.31$); 22.05% of eyes had a history of VRT or retinal detachment (RD) in the fellow eye; average RT: 1.39 ± 0.8 ($r=1-5$); 58.2% were myopic eyes ($p < 0,05$); 54.14% were symptomatic. In group 2, patients developed SVRT: 22 eyes from 20 patients, thus representing 9.95% of the total 201 patients studied, with a mean age of 53.3 ± 3.6 years ($r=30-69$); 63.6% men and 36.4% women ($p=0,13$); 45.5% ($p=0,30$) of eyes had a history of VRT or RD in the fellow eye; VRT average: 1.37 ± 0.5 ($r=1-2$) per eye; 85.7% of eyes were myopic ($p < 0,05$); 68.2% were asymptomatic ($p=0,07$). 81.8% of SVRTs occurred within 120 days after the first VRT.

Conclusions. In the course of a PVD, multiple VRTs or SVRTs can be diagnosed. SVRTs are a rare presentation of VRT, but they are more common in myopic eyes. 81.8% of SVRTs were diagnosed within 120 days after the first RT. If misdiagnosed or eventually left untreated they entail an increased risk of RD.

Distensões sucessivos durante o deslocamento posterior do vítreo

Objetivo. Analisar a apresentação de distensões retinianas vitreogênicas sucessivas (DRVS) em pacientes que desenvolveram distensões retinianas vitreogênicas (DRV) durante deslocamento posterior do vítreo (DPV) sintomático.

Material e métodos. Estudo retrospectivo de pacientes com DRV no curso de DPV do Serviço de Oftalmologia da Clínica Universitária Reina Fabiola desde 1991 até hoje. Foram avaliados 217 olhos em 201 pacientes consecutivos que apresentaram um ou mais DRV na evolução do DPV sintomático. Foi realizado um exame oftalmológico completo que incluiu oftalmoscopia binocular indireta com depressão escleral em todos os pacientes realizada pelo mesmo retinologista (JUZ). DRVS foi definido como DRV posterior ao diagnóstico inicial de um DRV.

Resultados. Os pacientes foram divididos em dois grupos. No grupo 1, os pacientes não apresentaram DRV sucessivos (DRVNS), apresentando apenas um único DRV no exame inicial, não desenvolvendo novas distensões durante o acompanhamento: 195 olhos em 181 pacientes; meia idade de $55,7 \pm 15,2$ anos ($r=15-89$); 52,8% mulheres e 47,2% homens ($p=0,31$); 22,05% dos olhos tinha antecedentes de DRV ou deslocamento de retina (DR) em olho contralateral; média de RT $1,39 \pm 0,8$ ($r=1-5$); 58,2% eram olhos míopes ($p < 0,05$); 54,14% foram sintomáticos. No grupo 2, os pacientes desenvolveram DRVS: 22 olhos em 20 pacientes, representando 9,95% do total de 201 pacientes estudados, com uma meia idade de $53,3 \pm 3,6$ anos ($r=30-69$); 63,6% homens e 36,4% mulheres ($p=0,13$); 45,5% ($p=0,30$) dos olhos tinha antecedentes de DRV ou DR no olho contralateral; média de DRV $1,37 \pm 0,5$ ($r=1-2$) por olho; 85,7% eram olhos míopes ($p < 0,05$); 68,2% foram sintomáticos ($p=0,07$). 81,8% dos DRVS ocorreram dentro dos 120 dias posteriores ao primeiro DRV.

Conclusões. Podem ser diagnosticadas numerosas DRV ou DRVS no curso de um DPV. Os DRVS são uma forma pouco frequente de apresentação dos DRV, sendo mais frequentes em míopes. 81,8% dos DRVS foram diagnosticados dentro dos 120 dias posteriores do primeiro RT. Se forem mal diagnosticados ou eventualmente não tratados supõem um aumento de risco para o desenvolvimento de DR.

Rehabilitación visual de pacientes con baja visión empleando un dispositivo optoelectrónico portátil y reconfigurable

Raponi M^{a,b}, Pawelko E^a, Arcusin L^c, Delrieux C^d

^aCentro de Investigaciones de Láseres y Aplicaciones (CEILAP), Instituto de Investigaciones Científicas y Técnicas para la Defensa (CITEDEF-CONICET), Buenos Aires.

^bEscuela de Ciencia y Tecnología (ECyT), Universidad Nacional de San Martín (Buenos Aires).

^cUniversidad Tecnológica Nacional. Facultad Regional Buenos Aires.

^dInstituto de Investigaciones en Ingeniería Eléctrica (IIIE-CONICET), Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca.

raponimarcelo@gmail.com

Objetivo. Desarrollar un dispositivo optoelectrónico de rehabilitación visual, capaz de mejorar la calidad de vida de pacientes con baja visión.

Materiales y métodos. El dispositivo consta de tres módulos: adquisición, procesamiento y visualización. La adquisición se efectúa a través de una webcam que permite ajustar su foco y capturar imágenes con alta resolución. Unos videolentes presentan al paciente los resultados del procesamiento digital realizado sobre las señales capturadas. La unidad de control es un sistema embebido del tipo ARM® Cortex™ A8. Las características más sobresalientes de la plataforma son: *reconfigurabilidad* (se adapta al paciente), *amplia conectividad*, *zoom digital/óptico*, *autofoco*, *visión aumentada* (para individuos con visión túnel), *OCR+TTS* (reconocimiento de caracteres y conversión de texto a voz), entre otras.

Resultados. Se realizaron experiencias con un paciente adulto que presenta cataratas congénitas, quien ne-

cesita leer partituras (es pianista) a una distancia de 80-100 cm. Las ayudas ópticas comerciales no le han sido de utilidad. Nuestro dispositivo le permite visualizar las partituras y ejecutar el instrumento sin inconvenientes.

Conclusiones. Se presentó el desarrollo de un dispositivo de rehabilitación visual destinado a mejorar la calidad de vida de individuos con disfunciones visuales severas. El sistema permite adquirir y procesar imágenes en tiempo real, efectuar un realce selectivo de la información visual y traducir dicha información a un patrón de estimulación apropiado para cada paciente. Se presentaron los resultados preliminares obtenidos en situaciones reales, los cuales muestran que el desarrollo es efectivamente aplicable como dispositivo de rehabilitación visual.

Subsidios. Emprendedores FONSOFT 2009.

Agradecimiento. Al Ing. Rodolfo Bonnin y al Dr. Ricardo Moure.

Visual rehabilitation of low-vision patients using a portable and reconfigurable optoelectronic device

Objective. To develop an optoelectronic device for visual rehabilitation with the aim of improving the quality of life of low-vision patients.

Material and methods. The device comprises three modules: acquisition, processing and visualization. Acquisition is performed by means of a webcam allowing its focus to be adjusted and therefore, high-resolution images to be acquired. With videolenses the patient is shown the results of the digital processing of the signals obtained. The control unit is an ARM® Cortex™ A8-type embedded system. The most outstanding features of the platform are: *reconfigurability* (it is adapted to the patient), *high connectivity*, *digital/optical zoom*, *autofocus*, *enhanced vision* (for individuals with tunnel vision), *OCR + TTS* (character recognition and text-to-speech conversion), among others.

Results. The device was tried on an adult patient with congenital cataract who needed to read music scores (he is a musician) at a distance of 80-100 cm. Optical aids available in the market were not useful to him. Our device enables him to visualize scores and to play his instrument without any difficulty.

Conclusions. We have described the development of a device for visual rehabilitation aimed at improving

the quality of life of individuals with severe visual dysfunctions. The system allows for real-time image acquisition and processing, selective enhancement of visual information and translation of this information into a stimulation pattern appropriate for each patient. The preliminary results obtained in real situations, which show that this development is effectively applicable as a visual rehabilitation device, are hereby presented.

Support. FONSOFT 2009 entrepreneurs

Acknowledgment. Engineer Rodolfo Bonnin and Dr. Ricardo Moure.

Reabilitação visual de pacientes com baixa visão usando um dispositivo optoeletrônico portátil e reconfigurável

Objetivo. Desenvolver um dispositivo optoeletrônico de reabilitação visual, capaz de melhorar a qualidade de vida de pacientes com baixa visão.

Materiais e métodos. O dispositivo possui três módulos: aquisição, processamento e visualização. A aquisição é realizada através de uma webcam que permite ajustar o foco e capturar imagens com alta resolução. Alguns vídeo-lentes apresentam ao paciente os resultados do processamento digital realizado sobre os sinais capturados. A unidade de controle é um sistema embebido do tipo ARM® Cortex™ A8. As características mais destacáveis da plataforma são: reconfigurabilidade (adapta-se ao paciente), ampla conectividade, zoom digital/óptico, autofoco, visão aumentada (para indivíduos com visão em túnel), OCR+TTS (reconhecimento de caracteres e conversão de texto para voz), entre outras.

Resultados. Foram realizadas experiências com um paciente adulto que apresenta cataratas congênitas, quem precisa ler partituras (ele é pianista) a uma distância de 80-100 cm. As ajudas ópticas comerciais não tem sido úteis. Nosso dispositivo permite ao paciente ver as partituras e executar o instrumento sem inconvenientes.

Conclusões. Apresentou-se o desenvolvimento de um dispositivo de reabilitação visual destinado a melhorar a qualidade de vida de indivíduos com disfunções visuais severas. O sistema permite adquirir e processar imagens em tempo real, efetuar um realce seletivo da informação visual e traduzir essa informação em um padrão de estimulação apropriado para cada paciente. Apresentaram-se os resultados preliminares obtidos em

situações reais, os quais mostram que o desenvolvimento é efetivamente aplicável como dispositivo de reabilitação visual.

Subsídios. Empreendedores FONSOFT 2009.

Sistema informático de detección de cambios retinales

Torres RM^{a,b,c}, Gelroth A^a, Rodríguez D^a, Salvatelli A^a, Drozdowicz B^a, Bizai G^a

^aGrupo de Inteligencia Artificial, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Entre Ríos (UNER), Oro Verde (Entre Ríos).

^bCentro de Ojos Dr. Lódolo, Paraná (Entre Ríos).

^cROMAT, Colonia Avellaneda (Entre Ríos).

romator7@hotmail.com

Objetivos. Discernir entre lo normal y lo patológico es un ejercicio diario del médico oftalmólogo. La experiencia de cada médico permite hacer este ejercicio con más eficacia y velocidad a lo largo de su carrera profesional, lo cual toma muchos años. Por lo tanto, el objetivo fue desarrollar un sistema informático que permita detectar cambios en imágenes (retinografías) del fondo de ojo de un paciente a diferentes tiempos y de forma automática.

Métodos. Se seleccionaron 40 pares de imágenes (retinografías) que presentaban cambios patológicos, evolutivos en el tiempo, de un mismo ojo (par de imágenes del mismo ojo: por ejemplo: A- sin hemorragias, B- con hemorragias). Las mismas fueron sometidas a un sistema informático, analizando lo siguiente: H- hemorragias; E- exudados; V- vasos; O- nervio óptico; R- retina. En éstas, el sistema evaluó los siguientes cambios potenciales: A- aparecen; D- desaparecen; F- cambio en formas. Lo mismo fue realizado por un oftalmólogo experimentado; se cotejaron ambos y se evaluó si lo detectado por el sistema era: adecuado, inadecuado, no existía, existía y no fue detectado. Este ejercicio fue realizado para retina y sobre el nervio óptico. Finalmente se evaluaron los tiempos computacionales, sensibilidad y especificidad del sistema para: detección (adecuada o no) y detección adecuada.

Resultados. El sistema logró una especificidad mayor al 99,6% para la mayoría de los ítems. La sensibilidad

fue del 84,6% para cambios en el nervio óptico, llegando a un 98,2% en detección de hemorragias en general. El tiempo de procesamiento computacional fue menor a 3 segundos en imágenes de 512 x 512 píxeles.

Conclusión. La selección, adaptación e implementación del presente sistema de detección de cambios en retinografías color resultó efectivo, confiable y rápido. Esto permite concluir que tiene un potencial clínico para ser incorporado en la dinámica diaria de la consulta oftalmológica.

Informatics system for detection of retinal changes

Objectives. To discriminate normal from pathological is a daily practice for ophthalmologists. Experience provides the physician with the ability to achieve this more efficaciously and faster along his professional career and this takes many years. Therefore, the goal of this paper was to develop an informatics system enabling the detection of changes in retinal fundus images (retinograms) from a patient at different time-points and automatically.

Methods. Forty pairs of images (retinograms) with pathologic changes, progressing with time, from the same eye (pair of images from the same eye: e.g. A- with no hemorrhages, b- with hemorrhages) were selected. These images were processed by an informatics system to analyze the following: H- hemorrhages, E- exudates, V- vessels, O- optic nerve, R- retina. The system evaluated the following potential changes in the images: A- appearing, D- disappearing, F- changes in shapes. An experienced ophthalmologist did the same; we compared both results and evaluated if what was detected by the system was: adequate, inadequate, non-existent, existent or undetected. This exercise was made for the retina and the optic nerve. Finally, computer times, sensitivity and specificity of the system were assessed for: detection (adequate or not) and adequate detection.

Results. The system achieved a specificity over 99.6% for most items. Sensitivity was 84.6% for optic nerve changes, with 98.2% of detection of hemorrhages achieved in general. Computer processing time was shorter than 3 seconds in 512 x 512 pixel images.

Conclusion. Selection, adaptation and implementation of this system for detection of color retinographic changes were evidenced to be effective, reliable and fast.

It may thus be concluded that it has clinical potential for its incorporation into the daily dynamics of ophthalmic practice.

Sistema informático de detecção de alterações retinianas

Objetivos. Discernir entre normal e patológico é um exercício diário do médico oftalmologista. A experiência de cada médico permite realizar esse exercício com mais eficácia e rapidez ao longo da prática de sua profissão, e isso demora muitos anos. Portanto, o objetivo foi desenvolver um sistema informático que permita detectar alterações em imagens (retinografias) do fundo de olho de um paciente em diferentes momentos e de forma automática.

Métodos. Foram selecionados 40 pares de imagens (retinografias) que apresentavam alterações patológicas, evolutivas no tempo, de um mesmo olho (par de imagens do mesmo olho: por exemplo: A- sem hemorragias, B- com hemorragias). Elas foram submetidas a um sistema informático mediante o qual foram analisados: H- hemorragias; E- exsudatos; V- vasos; O- nervo óptico; R- retina. O sistema avaliou nelas as seguintes alterações potenciais: A- aparecem; D- desaparecem; F- alteração nas formas. O mesmo procedimento foi realizado por um oftalmologista experiente; ambos foram cotejados e avaliou-se se o resultado detectado pelo sistema era: adequado, inadequado, existente, existia e não foi detectado. Este exercício foi realizado para retina e sobre o nervo óptico. Finalmente foram avaliados os tempos computacionais, sensibilidade e especificidade do sistema para: detecção (adequada ou não) e detecção adequada.

Resultados. O sistema atingiu uma especificidade maior a 99,6% para a maioria dos itens. A sensibilidade foi de 84,6% para alterações no nervo óptico, alcançando 98,2% em detecção de hemorragias em geral. O tempo de processamento computacional foi menor de 3 segundos em imagens de 512 x 512 pixels.

Conclusão. A seleção, adaptação e implementação do presente sistema de detecção de alterações em retinografias color resultou efetivo, confiável e rápido. Isso permite concluir que ele tem um potencial clínico para ser incorporado na dinâmica diária da consulta oftalmológica.

MESA REDONDA / ROUND TABLE / MESA REDONDA

Las células progenitoras de la retina en la proliferación vitreorretinal

Zas M

Hospital de Clínicas, Universidad de Buenos Aires.

Objetivo. Describir la composición celular de las membranas epirretinales obtenidas de pacientes con diferentes tipos fisiopatológicos de desprendimiento de retina asociado a proliferación vitreorretinal (PVR) realizando inmunomarcación para células progenitoras de las membranas epirretinales obtenidas.

Descripción. Se analizaron 9 (nueve) pacientes con distintos tipos fisiopatológicos de desprendimiento de retina regmatógeno y PVR según la clasificación de 1989, en los cuales se realizó una vitrectomía por pars plana para su resolución. Fueron 5 mujeres y 4 hombres cuya edad promedio fue de 59,22 años.

Materiales y métodos. Se incluyeron pacientes con desprendimiento de retina (DR) regmatógeno miópico, pacientes con DR regmatógeno pseudofáquico y pacientes con DR traumático. Se excluyeron pacientes con retinopatía diabética proliferativa, pacientes con DR secundarios a tumores intraoculares, uveítis posteriores, vasculopatías retinales y diálisis retinal. Luego del examen preoperatorio se les realizó una vitrectomía por pars plana que incluía el pelaje de las membranas epirretinales, las que luego se sometieron a inmunofluorescencia siguiendo el protocolo diseñado de libre flotación o *free floating*. Para los controles positivos se utilizó membrana amniótica criopreservada y melanoma corioideo. Del material obtenido se realizó también observación con microscopía confocal.

Resultados. Las tres membranas epirretinales de los pacientes con proliferación vitreorretinal secundarias al trauma ocular, ya sea contuso (caso 2) o penetrante (casos 5 y 6), expresaron marcadores de células progenitoras de la retina. Las membranas de los pacientes con desprendimiento de retina miópico fueron negativas (casos 4 y 9) y sólo 2/4 (casos 1 y 7) de los casos de desprendimiento de retina pseudofáquicos fueron positivos a la retina. Las células multipotenciales participa-

rían en los casos más severos de proliferación vitreorretinal secundarios al trauma ocular contuso o penetrante.

Se desconoce a la fecha su rol o roles determinantes, como así también su interrelación con otros grupos celulares presentes en las membranas de esta entidad de cicatrización patológica.

Conclusiones. Las células progenitoras de la retina se hallan presentes en las membranas epirretinales de los pacientes con desprendimiento de retina y proliferación vitreorretinal secundarias al trauma ocular, ya sea contuso o penetrante. No están presentes en la proliferación vitreorretinal de los desprendimientos de retina miópicos y sólo en 2/4 en los casos del desprendimiento de retina pseudofáquico.

Los resultados sugieren que las células multipotenciales tendrían alguna relación con la magnitud o el grado de trauma o lesión y posiblemente con el desarrollo de la PVR.

Retinal progenitor cells in vitreoretinal proliferation

Objective. To describe the cellular composition of epiretinal membranes from patients with different pathophysiologic types of retinal detachment associated with vitreoretinal proliferation (VRP) by immunomarking of the progenitor cells of the epiretinal membranes obtained.

Description. Analysis of nine patients with different pathophysiologic types of rhegmatogenous retinal detachment and VRP according to the 1989 classification, who underwent pars plana vitrectomy for their resolution. Patients were 5 women and 4 men with an average age of 59.22 years.

Materials and methods. The inclusion criteria was: myopic rhegmatogenous retinal detachment (RD), pseudophakic rhegmatogenous RD and traumatic RD. Patients with proliferative diabetic retinopathy, RD secondary to intraocular tumors, posterior uveites, retinal vasculopathies and retinal dialysis were excluded. Pars plana vitrectomy was performed after preoperative examination. The procedure included peeling of the epiretinal membranes and, afterwards, they were analyzed by immunofluorescence according to the designed free

floating protocol. Cryopreserved amniotic membrane and choroidal melanoma were used for positive controls. The analysis also included observation of the material obtained with confocal microscopy.

Results. The three epiretinal membranes from patients with vitreoretinal proliferation secondary to ocular trauma, either blunt (case 2) or penetrating (cases 5 and 6), expressed retinal progenitor cell markers. Membranes from patients with myopic retinal detachment were negative to nestin (cases 4 and 9) and only 2/4 (cases 1 and 7) of pseudophakic retinal detachment cases were positive. Multipotential cells may be involved in the most severe cases of vitreoretinal proliferation secondary to blunt or penetrating ocular trauma.

To date, their determinant role or roles remain unknown, as well as their interrelationship with other cellular groups that are present in the membranes of this pathological scarring entity.

Conclusions. Retinal progenitor cells are present in the epiretinal membranes of patients with retinal detachment and vitreoretinal proliferation secondary to ocular trauma—either blunt or penetrating. They are not present in the vitreoretinal proliferation of myopic retinal detachments and in only 2/4 of cases of pseudophakic retinal detachment.

Results suggest that multipotential cells might have some relationship with the extent or degree of trauma or injury, and, perhaps, with VRP development.

As células progenitoras da retina na proliferação vitreoretiniana

Objetivo. Descrever a composição celular das membranas epirretinianas obtidas de pacientes com diferentes tipos fisiopatológicos de deslocamento da retina associado à proliferação vitreoretiniana (PVR) realizando imunomarcagem para as células progenitoras das membranas epirretinianas obtidas.

Descrição. Foram analisados 9 (nove) pacientes com distintos tipos fisiopatológicos de deslocamento de retina regmatogênico e PVR segundo a classificação de 1989. Nos quais foi feita vitrectomia via pars plana para resolução. Foram 5 mulheres e 4 homens cuja idade média era de 59,22 anos.

Materiais e métodos. Foram incluídos pacientes com deslocamento de retina (DR) regmatogênico miópico, pacientes com DR regmatogênico pseudofácico e pa-

cientes com DR traumático. Foram excluídos pacientes com retinopatia diabética proliferativa, pacientes com DR secundários a tumores intraoculares, uveítes posteriores, vasculopatias retinianas e diálise retiniana. Após o exame pré-operatório foi realizada uma vitrectomia via pars plana que incluía a pelagem das membranas epirretinianas, que depois foram submetidas a imunofluorescência conforme o protocolo projetado de livre flotação ou *free floating*. Para os controles positivos foi utilizada membrana amniótica criopreservada e melanoma de coróide. Do material obtido foi realizada também observação com microscopia confocal.

Resultados. As três membranas epirretinianas dos pacientes com proliferação vitreoretiniana secundária ao trauma ocular, seja contuso (caso 2) ou penetrante (casos 5 e 6), expressaram marcadores de células progenitoras da retina. As membranas dos pacientes com deslocamento de retina miópico foram negativas (casos 4 e 9) e apenas 2/4 (casos 1 e 7) dos casos de deslocamento de retina pseudofácico foram positivos para nestina. As células multipotenciais participariam nos casos mais severos de proliferação vitreoretiniana secundários ao trauma ocular contuso ou penetrante. Até hoje, é desconhecida sua função ou funções determinantes, bem como a sua inter-relação com outros grupos celulares presentes nas membranas desta entidade de cicatrização patológica.

Conclusões. As células progenitoras da retina estão presentes nas membranas epirretinianas dos pacientes com deslocamento de retina e proliferação vitreoretiniana secundárias ao trauma ocular, seja contuso ou penetrante. Não estão presentes na proliferação vitreoretiniana dos deslocamentos de retina miópicos e só em 2/4, nos casos de deslocamento de retina pseudofácico. Os resultados sugerem que as células multipotenciais teriam alguma relação com a magnitude ou grau de trauma ou lesão e possivelmente, com o desenvolvimento da PVR.

La regeneración de la retina de pez cebra depende de la expresión y actividad de moléculas de señalización purinérgica

Battista A, Faillace MP

Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas (IQUIFIB-CO-NICET), Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.
pfaillace@qb.ffyb.uba.ar

Objetivo. El objetivo de nuestro estudio se basó en investigar el rol de las señales purinérgicas en la regeneración de la retina adulta que sigue a una lesión citotóxica global o parcial.

Descripción. La retina adulta de pez de cebra exhibe regeneración y crecimiento que ocurren durante la vida del animal. Este modelo experimental ha ayudado a identificar moléculas y procesos que controlan la proliferación y la diferenciación celular. Por otro lado, las señales purinérgicas representadas por los nucleótidos/nucleósidos extracelulares, los receptores P y las ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasas (NTPDasas) son esenciales para regular la actividad proliferativa en el desarrollo del sistema nervioso de vertebrado. Particularmente se demostró que las señales purinérgicas poseen un rol central en la génesis del ojo y la retina en embriones de *Xenopus laevis*.

Materiales y métodos. Se examinó si las células de la retina lesionada proliferaban ya sea en ausencia o presencia de señales purinérgicas endógenas. Además se exploró si la expresión de receptores P y de NTPDasas, que regulan la concentración extracelular de nucleótidos, resultaba modificada en las retinas dañadas.

Resultados. Los resultados dieron evidencia de que las señales purinérgicas controlan la proliferación celular para la regeneración retinal del pez cebra adulto, proveyendo un número adecuado de células progenitoras de manera independiente de la magnitud de la lesión. Tanto la actividad de las NTPDasas como del ADP sobre los receptores P2Y1 fueron esenciales para regular el ingreso a la fase S del ciclo celular de los progenitores retinales durante la regeneración. Asimismo, describimos por primera vez varios receptores P2 expresados por la retina adulta del pez cebra a nivel transcripcional.

Un daño global de la retina adulta de pez cebra causó un incremento y modificó la distribución de los receptores P2Y1, los que también son expresados por algunas células proliferativas, surgiendo un control directo de su actividad mitótica. Los niveles de los ARN mensajeros de las NTPDasas resultaron también incrementados luego de la lesión. La remoción de los nucleótidos extracelulares por un tratamiento intraocular con apirasa incrementó significativamente la muerte celular en las retinas dañadas. Este efecto fue parcialmente reproducido por bloqueo de los receptores P.

Conclusión. Los nucleótidos extracelulares son necesarios para controlar la actividad del ciclo celular e incrementar la proliferación de las células progenitoras durante la reparación de la retina, independientemente de la magnitud de la injuria. Las señales purinérgicas limitan la muerte celular durante el proceso de regeneración.

Subsidios. PIP 0169 CONICET 2009-2011-UBA-CYT 0823 2011-1014.

Zebra fish retinal regeneration depends on the expression and activity of purinergic signaling molecules

Objective. The goal of our study was to investigate the role of purinergic signals in the regeneration of adult retinas following a global or partial cytotoxic injury.

Description. Adult zebra fish retinas exhibit regeneration and growth along their lives. This experimental model has helped identify molecules and processes controlling cell proliferation and differentiation. On the other hand, the purinergic signals represented by extracellular nucleotides/nucleosides, P receptors and nucleoside triphosphate diphosphohydrolases (NTPDases) are vital to regulate proliferative activity in the development of the vertebrate nervous system. It was particularly demonstrated that purinergic signals have a central role in the ocular and retinal genesis in *Xenopus laevis* embryos.

Materials and methods. We examined whether the cells of the damaged retina proliferated either in the presence or absence of endogenous purinergic signals. We further explored whether the expression of P receptors and NTPDases, which regulate nucleotide extracellular concentration, was modified in damaged retinas.

Results. The results evidenced that purinergic signals control cell proliferation for adult zebra fish retinal regeneration, thus providing an adequate number of progenitor cells independently of the extent of the injury. Both NTPDase and ADP activity on P2Y1 receptors was essential for the regulation of entry of retinal progenitors into the S-phase of the cell cycle during regeneration. Furthermore, to our knowledge, this is the first description of several P2 receptors expressed by the adult zebra fish retina at the transcriptional level. Adult zebra fish global retinal injury caused an increase and modification in the distribution of P2Y1 receptors, which are also expressed by some proliferative cells, with emergence of direct control of their mitotic activity. NTPDase RNA messenger levels were also increased after the injury. Extracellular nucleotide removal induced by intraocular therapy with apyrase significantly increased cell death in damaged retinas. This effect was partially reproduced by P receptor blockade.

Conclusion. Extracellular nucleotides are necessary to control the activity of the cell cycle and to increase progenitor cell proliferation during retinal repair independently of the extent of the injury. Purinergic signals limit cell death during the regeneration process.

Supports. PIP 169 CONICET 2009-2011-UBA-CYT 0823 2011-1014.

A regeneração da retina de peixe-zebra depende da expressão e atividade de moléculas de sinalização purinérgica

Objetivo. O objetivo de nosso estudo esta baseado na pesquisa do rol dos sinais purinérgicos na regeneração da retina adulta após uma lesão citotóxica global ou parcial.

Descrição. A retina adulta de peixe-zebra exhibe a regeneração e o crescimento que ocorrem durante a vida do animal. Esse modelo experimental tem ajudado a identificar moléculas e processos que controlam a proliferação e a diferenciação celular. Além disso, os sinais purinérgicos representados pelos nucleotídeos extracelulares, os receptores P e as ectonucleósido trifosfato difosfohidrolases (NTPDases) são essenciais para regular a atividade proliferativa no desenvolvimento do sistema nervoso de vertebrados. Particularmente foi demonstrado que os sinais purinérgicos possuem um papel central

na gênese do olho e na retina em embriões de *Xenopus laevis*.

Materiais e métodos. Foi examinado se as células da retina lesionada proliferavam, seja em ausência ou presença de sinais purinérgicos endógenos. Além disso, explorou-se se a expressão de receptores P e de NTPDases, que regulam a concentração extracelular de nucleotídeos, resultava modificada nas retinas lesadas.

Resultados. Os resultados evidenciaram que os sinais purinérgicos controlam a proliferação celular para a regeneração retiniana do peixe-zebra adulto, fornecendo um número adequado de células progenitoras de maneira independente da magnitude da lesão. Tanto a atividade das NTPDases como do ADP sobre os receptores P2Y1 foram essenciais para regular o ingresso à fase S do ciclo celular dos progenitores retinianos durante a regeneração. Do mesmo modo, descrevemos, pela primeira vez, vários receptores P2 expressos pela retina adulta do peixe-zebra em nível transcricional. Um dano global da retina adulta do peixe-zebra causou aumento e alterou a distribuição dos receptores P2Y1, os quais também são expressos por algumas células proliferativas, surgindo assim um controle direto da atividade mitótica. Os níveis dos ARN mensageiros das NTPDases resultaram também incrementados após a lesão. A remoção dos nucleotídeos extracelulares por um tratamento intraocular com apirase incrementou significativamente a morte celular nas retinas lesadas. Esse efeito foi parcialmente reproduzido por bloqueio dos receptores P.

Conclusão. Os nucleotídeos extracelulares são necessários para controlar a atividade do ciclo celular e para incrementar a proliferação das células progenitoras durante a reparação da retina, independentemente da magnitude do dano. Os sinais purinérgicos limitam a morte celular durante o processo de regeneração

Subsídios. PIP 0169 CONICET 2009-2011-UBA-CYT 0823 2011-1014.

Rol de las células gliales de Müller en la regeneración de la retina

Politi L, Simón V, Volanté Y, De Genaro P, Rotstein N

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

La muerte por apoptosis de las neuronas fotorreceptoras es la causa principal de ceguera observada en enfermedades neurodegenerativas de la retina como la retinitis pigmentosa o la degeneración macular asociada con la edad. Las dos estrategias principales para alcanzar una terapia más efectiva o eventualmente la cura de estas enfermedades se basan en detener la apoptosis y, más recientemente, en regenerar las neuronas eliminadas a partir de células madre. Las células gliales de Müller (CGM) han sido propuestas como células madre en la retina, capaces de transdiferenciarse en fotorreceptores (FR) y de regenerar a los FR perdidos durante el transcurso de estas patologías. Trabajos previos de varios laboratorios, incluyendo el nuestro, indicarían que las CGM expresan varios de los marcadores de las células madre. Sin embargo, hasta el momento no existen evidencias directas de la transformación de estas células en FR.

Recientemente demostramos que en cultivos de retinas de rata las CGM pueden inducir a las células progenitoras de retina a transformarse en células madre multipotentes. Notablemente, estas células multipotentes, bajo condiciones controladas de cultivos, pueden diferenciarse en neuronas con características morfológicas, moleculares y funcionales de los FR.

Estos hallazgos abren la posibilidad de utilizar a las CGM para regenerar a las neuronas eliminadas en estas enfermedades devastadoras de la retina.

Subsidios. FONCYT, CONICET y UNS.

The role of Müller glial cells in retinal regeneration

Apoptotic death of photoreceptor neurons is the main cause of blindness observed in retinal neurodegenerative diseases such as retinitis pigmentosa or age-related macular degeneration. The two main known strategies to achieve a more effective therapy or, eventually, to cure these diseases are aimed at apoptosis detention, and, more recently, at regeneration of eliminated neurons from stem cells. Müller glial cells (MGCs) have been proposed as stem cells in the retina, able to transdifferentiate into photoreceptors (PRs) and to regenerate lost PRs during the course of these diseases. Previous investigations from several laboratories, including ours, indicate that MGCs express several stem cell markers. However, to date, there is no direct evidence of the transformation of these cells into PRs. We have recently demonstrated that in rat retinal cultures, MGCs can induce retinal progenitor cell transformation into multipotent stem cells. Strikingly, these multipotent cells, under controlled culture conditions, can differentiate into neurons with morphological, molecular and functional features of PRs. These findings pave the way for the use of MGCs for regeneration of neurons eliminated in these devastating retinal diseases.

Função das células gliais de Müller na regeneração da retina

A morte por apoptose dos neurônios fotorreceptores é a causa principal de cegueira observada em doenças neurodegenerativas da retina, tais como a retinose pigmentar ou degeneração macular associada com a idade. As duas estratégias principais para atingir uma terapia mais efetiva e, eventualmente, a cura destas doenças baseiam-se em parar a apoptose e, mais recentemente, na regeneração dos neurônios removidos a partir de células-tronco. As células gliais de Müller (CGM) têm sido propostas como células-tronco na retina, capazes de transdiferenciação em fotorreceptores (FR) e de regenerar os FR perdidos no decorrer destas patologias. Trabalhos anteriores de vários laboratórios, incluindo o nosso, manifestariam que as CGM expressam vários dos marcadores das células-tronco. No entanto, até agora não existem evidências diretas da transformação dessas células em FR.

Recentemente mostramos que em culturas de retinas de ratos, as CGM podem induzir as células progenitoras da retina a se tornarem células -tronco pluripotentes. Notavelmente, estas células pluripotentes, sob condições controladas de culturas, podem diferenciar-se em neurônios com características morfológicas, moleculares e funcionais dos FR. Estes achados abrem a possibilidade de utilizar as CGM para regenerar os neurônios eliminados nestas doenças devastadoras da retina

Subsídios. FONCYT, CONICET e UNS.

Pax6, control del ciclo celular y plasticidad de las células precursoras retinales

Cantó-Soler V

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

Dado el carácter dinámico del patrón de la expresión del gen Pax6 durante el desarrollo retinal se estima que el Pax6 desempeña un papel importante durante la diferenciación de las células progenitoras de la retina, aunque su participación exacta y el momento puntual de su función aún no han sido del todo esclarecidos. El objetivo del presente estudio consistió en analizar la función del Pax6 durante la diferenciación de las células retinales mediante la sobreexpresión de Pax6 en la retina de pollitos.

Se inyectaron virus RCAS-Pax6 y RCAS-GFP (control) en la papila derecha de embriones de pollito en el día embrionario (DE) 3. Además, en algunos embriones se aplicó una inyección de un análogo de timidina EdU en la papila 5 horas antes de la cosecha. Los embriones fueron fijados en diferentes estadios del desarrollo y procesados para su análisis inmunohistoquímico a fin de determinar los marcadores específicos del tipo de célula retinal.

La sobreexpresión de Pax6 no afectó el patrón espacial y temporal del nacimiento de células neuronales durante el período normal de neurogénesis (DE: 3-8). Sin embargo, en los estadios 35-36 (DE: 9-10), se ob-

servó una segunda ola de neurogénesis en las regiones retinales infectadas con RCAS-Pax6. Estos precursores neuronales recién generados expresaron los marcadores celulares específicos para las células ganglionares, amácrimas, bipolares y horizontales, pero no así para los fotorreceptores. Un análisis más exhaustivo reveló que la infección con RCAS-Pax6 indujo la expresión sostenida de Pax6 a niveles fisiológicos en precursores neuronales postmitóticos y este fenómeno se acompañó de un aumento significativo en la proliferación celular.

En conjunto, estos resultados sugieren que la expresión sostenida del Pax6 en los precursores celulares postmitóticos *in vivo* es suficiente para inducir el ingreso de estas células al ciclo y generar una segunda ola de neurogénesis.

Pax6, cell cycle control and plasticity of retinal precursor cells

The dynamic pattern of Pax6 expression during retinal development suggests that Pax6 plays an important role during retinal progenitor differentiation, but the exact role(s) and timing of its function remain unclear. The purpose of this study was to analyze the function of Pax6 during retinal cell differentiation by overexpressing Pax6 in the chick retina.

Embryonic day (ED) 3 chick embryos were injected with RCAS-Pax6 and RCAS-GFP (control) viruses into the right optic cup. Additionally, some embryos received an injection of the thymidine analog EdU into the right optic cup 5 hours before harvest. Embryos were fixed at different stages of development and processed for immunohistochemical analysis for retinal cell-type specific markers.

Overexpression of Pax6 did not affect the spatial and temporal pattern of neuronal cell birth during the normal period of neurogenesis (ED3-8). However, at stages 35-36 (ED9-10), a second wave of neurogenesis was observed in RCAS-Pax6 infected retinal regions. These newly generated neuronal precursors expressed cell markers specific for ganglion, amacrine, bipolar and horizontal cells, but not for photoreceptors. Further analysis revealed that infection with RCAS-Pax6 induced sustained expression of Pax6 at physiological levels in postmitotic neuronal precursors accompanied by a significant increase in cell proliferation.

Taken together these results suggest that sustained expression of Pax6 in postmitotic retinal precursors in vivo is sufficient to induce these cells to re-enter the cycle and generate a second wave of neurogenesis.

Pax6, controle do ciclo celular e plasticidade das células precursoras retinianas

Dado o caráter dinâmico do padrão da expressão do gene Pax6 durante o desenvolvimento retiniano estima-se que o Pax6 desempenha um papel importante durante a diferenciação das células progenitoras da retina, embora sua participação exata e o momento pontual da sua função ainda não tenham sido totalmente esclarecidos. O objetivo do presente estudo baseou-se em analisar a função do Pax6 durante a diferenciação das células retinianas mediante a superexpressão de Pax6 na retina de pintos.

Injetaram-se vírus RCAS-Pax6 e RCAS-GFP (controle) na papila direita de embriões de pinto no dia embrionário (DE) 3. Além disso, em alguns embriões

foi aplicada uma injeção de um análogo de timidina EdU na papila 5 horas antes da colheita. Os embriões foram fixados em diferentes estágios do desenvolvimento e processados para análise imunohistoquímica para determinar os marcadores específicos do tipo de célula retiniana.

A superexpressão de Pax6 não afetou o padrão espacial e temporal do nascimento de células neuronais durante o período normal de neurogênese (DE: 3-8). Porém, nos estágios 35-36 (DE: 9-10), foi observada uma segunda onda de neurogênese nas regiões retinianas infetadas com RCAS-Pax6. Esses precursores neuronais recém gerados expressaram os marcadores celulares específicos para as células ganglionares, amácrimas, bipolares e horizontais, mas não para os fotorreceptores. Uma análise mais exaustiva revelou que a infecção com RCAS-Pax6 induziu a expressão sustentada de Pax6 em níveis fisiológicos em precursores neuronais pós-mitóticos e esse fenômeno foi acompanhado de um aumento significativo na proliferação celular.