

Oftalmología clínica y experimental

Publicación científica del Consejo Argentino de Oftalmología · Volumen 14 · Suplemento 2 · Diciembre 2021 · ISSNn 2718-7446



**REUNION ANUAL
AIVO 2021**

UNA VISIÓN CONJUNTA

28-30 OCTUBRE | FORMATO VIRTUAL

AIVO International Chapter Affiliate **AIVO**
Asociación de Investigación en Visión y Oftalmología

OCE

14.S2

CAO

Resúmenes de investigaciones presentadas en el XIII Congreso Nacional de la Asociación de Investigación en Visión y Oftalmología (AIVO)

Llevado a cabo del 28 al 30 de octubre de 2021 desde Buenos Aires en formato virtual

Abstracts of research papers presented at the 13th National Meeting of the "Asociación de Investigación en Visión y Oftalmología" (AIVO) [Association of Research in Vision and Ophthalmology]

Held from Buenos Aires in virtual format, October 28th to 30th, 2021

Oftalmol Clin Exp (ISSN 1851-2658)
2021; 14(S2): S1-S31.

Comité Organizador

Dr. Jeremías Galletti
Dra. María Cecilia Sánchez
Dr. Rodrigo Martín Torres
Dra. Olga Lorena German
Dr. Damián Dorfman
Dra. Melina Valeria Mateos
Dra. Magalí Silberman
Dra. María Mercedes Benedetto
Dr. Pablo Barrionuevo
Dr. Tomas Ortiz Basso

1

Inhibición de la neovascularización retinal mediada por doxiciclina: estudios *in vitro* e *in vivo*

María L. Formica^{1*}, María Constanza Paz¹, Paula Virginia Subirada², Belén Joray³, María Victoria Vaglianti², Pablo Federico Barcelona², José Luna Pinto⁴, Palma Santiago¹, María Cecilia Sánchez²

¹ *Unidad de Investigación y Desarrollo en Tecnología Farmacéutica (UNITEFA-CONICET) y Departamento de Ciencias Farmacéuticas, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.*

² *Centro de Investigación en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI-CONICET) y Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.*

³ *IRNASUS-CONICET, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Católica de Córdoba, Córdoba, Argentina.*

⁴ *Departamento de Vítreo-Retina, Centro Privado de Ojos Romagosa, Fundación VER, Córdoba, Argentina.*

*lina.formica@unc.edu.ar

Objetivos: Con el objetivo de ampliar los blancos terapéuticos en la neovascularización (NV) asociada a patologías retinales isquémicas, se evaluó el efecto *in-vitro* e *in-vivo* de la doxiciclina (DXC) sobre las MMPs y la NV retinal.

Materiales y métodos: Se evaluó la citotoxicidad de DXC en células gliales de Müller (MIO-M1) y en endoteliales de aorta bovina (BAEC) mediante ensayo MTT, mientras que el efecto de

DXC sobre la actividad enzimática de MMP-2 y 9 en MIO-M1 por zimografía y sobre la formación de túbulos en BAEC. En ratones C57BL/6 WT, se evaluó la tolerancia a DXC intravítrea (iv) mediante estudios ERG e histología retinal con H-Eo. En un modelo de retinopatía inducida por oxígeno (OIR) en ratones, se evaluó el efecto de DXC (iv) sobre la actividad y expresión de MMP-2 en homogenatos de retina por zimografía y western-blot; y sobre la NV retinal mediante tinción con isolectina GSA IB4 y anti-MMP 2 en retina montada completa.

Resultados: DXC presentó una citotoxicidad menor al 20% por debajo de 60 µg/mL (MIO-M1) y 6,25 µg/mL (BAEC). En comparación a células incubadas con vehículo, DXC disminuyó significativamente (39±3)% y (52±4)% la actividad basal de MMP-2 y MMP-9 en MIO-M1, respectivamente; y (56±13)% la formación de túbulos de BAEC. En ratones C57BL/6, DXC no modificó los parámetros de ERG, ni la histología retinal. Se observó una tendencia de disminución en la actividad de MMP-2 y la NV retinal en ratones OIR tratados con DXC en comparación al grupo control (vehículo).

Conclusión: DXC, en dosis no citotóxicas, presentó acción inhibitoria sobre la actividad de MMPs tanto *in-vitro* como en la retina de ratones OIR, además de propiedades antiangiogénicas.

Doxycycline-mediated inhibition of retinal neovascularization: studies *in vitro* and *in vivo*

Objectives: With the aim of analyzing groundbreaking therapeutics in neovascularization (NV) associated with ischemic retinal pathologies, the *in-vitro* and *in vivo* effect of doxycycline (DXC) on matrix metalloproteinases (MMPs) and retinal NV was evaluated.

Materials and methods: The cytotoxicity of DXC in Müller glial (MIO-M1) and in bovine aortic endothelial cells (BAEC) was evaluated by MTT assay, while the effect of DXC on the enzymatic activity of MMP-2 and 9 in MIO-M1 by zymography and on tube-formation assay in BAEC. In C57BL/6 WT mice, tolerance to intravitreal (iv) DXC was assessed by ERG studies and retinal histology with H-Eo. In oxygen-in-

duced retinopathy (OIR) mice model, the effect of DXC (iv) on the activity and expression of MMP-2 was evaluated in retinal homogenates by zymography and western blot; and on retinal NV by isolectin GSA-IB4 and anti-MMP-2 staining in whole mounted retina.

Results: DXC presented a cytotoxicity less than 20% below 60 µg/mL (MIO-M1) and 6.25 µg/mL (BAEC). In comparison to cells incubated with vehicle, DXC significantly decreased (39±3)% and (52±4)% the basal activity of MMP-2 and MMP-9 in MIO-M1, respectively; and (56±13)% the BAEC tube formation. In C57BL/6 mice, DXC did not alter ERG parameters or retinal histology. A decreasing trend in MMP-2 activity and retinal NV was observed in OIR mice treated with DXC compared to control group (vehicle).

Conclusion: DXC, in non-cytotoxic doses, exhibited inhibitory action on the activity of MMPs both *in vitro* and in the retina of OIR mice, as well as antiangiogenic properties.

2

La actividad de la monoacilglicerol lipasa asociada al segmento externo de los bastones retinales es regulada por las proteínas involucradas en el proceso de fototransducción

Estefanía Chamorro Aguirre*, Virginia Gaveglio, Ana Clara Pascual, Susana Pasquaré

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

*echamorro@inibibb-conicet.gob.ar

Objetivos: Determinar si la actividad de la monoacilglicerol lipasa (MAGL) del segmento externo de los bastones (ROS) era modulada por las proteínas involucradas en el proceso de fototransducción.

Materiales y métodos: La actividad enzimática fue ensayada en las membranas de los ROS tratados con buffers de diferente fuerza iónica, empleando como sustrato monoacilglicerol radiomarcado. Los ROS fueron aislados y purificados de retinas bovinas previamente adaptadas a oscuridad. Estos fueron resuspendidos en buffer Tris-HCL 5 mM (remueve proteínas solu-

bles y periféricas) o Tris-HCL 100 mM (remueve proteínas solubles) a pH 7,4 y expuestos a 3000 luxes por 30 minutos a 25°C (ROS B) o mantenidos en oscuridad a 4°C (ROS O). Luego, los ROS fueron pasados 15 veces por aguja G25x5/8 y centrifugados a 50000xg durante 15 minutos para obtener la fracción de membrana. Las proteínas fueron resueltas por electroforesis y visualizadas por tinción con Coomassie blue.

Resultados: El tratamiento a 5 mM en oscuridad extrajo las proteínas: fosfodiesterasa (PDE), rodopsina quinasa (RK), transducina (T α) y parte de la arrestina; mientras que el mismo tratamiento en luz produjo la extracción de todas ellas excepto la T α . El tratamiento a 100 mM en oscuridad o luz extrae totalmente la RK y en alta proporción a la arrestina. La actividad MAGL en membrana de ROS O y ROS B (5 mM) disminuyó 27% y 18%, respectivamente, en relación a la observada en el ROS (O/B) entero.

Conclusión: Estos resultados podrían sugerir un estímulo de la PDE sobre la actividad de la MAGL, ya que en su ausencia la actividad de esta disminuye.

Monoacylglycerol lipase activity associated with the retinal rod outer segment is regulated by the proteins involved in the phototransduction process

Objectives: The purpose of this work was to determine if monoacylglycerol lipase (MAGL) activity of the rod outer segment (ROS) was modulated by the proteins involved in the phototransduction process.

Materials and methods: The enzymatic activity was evaluated in ROS membranes treated with buffers of different ionic strength, using radiolabelled monoacylglycerol as substrate. ROS were isolated and purified from dark-adapted bovine retinas. ROS were resuspended in 5 mM Tris-HCL buffer (removes soluble and peripheral proteins) or 100 mM Tris-HCL (removes soluble proteins) at pH 7.4 and exposed to 3000 lux for 30 minutes at 25 °C (ROS B) or kept in the dark at 4 °C (ROS O). Then, ROS were passed 15 times through a G25x5/8 needle and centrifuged at 50000xg for 15 minutes to obtain the membrane fraction.

Results: Proteins were resolved by electrophoresis and visualized by Coomassie blue staining. Treatment at 5 mM in dark extracted the proteins: phosphodiesterase (PDE), rhodopsin kinase (RK), transducin (T α) and partially arrestin; while the same treatment in light produced the extraction of all of them except T α . Treatment at 100 mM in darkness or light extracts RK completely and a high proportion of arrestin. MAGL activity in ROS O and ROS B (5 mM) membranes decreased 27% and 18%, respectively, with respect to that observed in whole ROS (O/B).

Conclusion: These results could suggest a stimulus of PDE on MAGL activity, since this activity decreases in absence of PDE.

3

Diseño del primer ensayo clínico de IMVALVSP1: método experimental y computacional

Guarnieri Fabio^{1-2*}, Nicolas Vottero¹, Gustavo Santiago¹, Rodrigo M. Torres^{1,3}

¹ iMvalv SA, Sunchales, Santa Fe, Argentina.

² CONICET-CIMEC, PTLC, Santa Fe, Argentina.

³ ROMAT Creator Center, Colonia Avellaneda, Entre Ríos, Argentina.

*aguarni@santafe-conicet.gov.ar

Objetivos: Según la 510K Aqueous Shunts de la FDA, se requieren ensayos hidráulicos de gravedad, caudal constante, apertura y cierre, así como un estudio multicéntrico de 50 pacientes para demostrar la seguridad y eficacia de los implantes de drenaje para glaucoma refractario. En este trabajo se propone realizar un diseño del ensayo clínico de un nuevo implante IMVALVSP1 de drenaje, realizando una simulación numérica del mismo a partir de los ensayos *in vitro* realizados.

Materiales y métodos: Se realizaron ensayos de gravedad, caudal constante y apertura y cierre en varios dispositivos con distintos diseños del sistema valvular, siguiendo las 510K Aquos Shunts de la FDA. Se realizó un modelo del sistema implante-ojo siguiendo trabajos anteriores (Sassetti-Guarnieri *et al.*, 2009-2014) introduciendo los parámetros obtenidos en los ensayos hidráulicos de cada implante ensayado.

Resultados: Los resultados obtenidos en los ensayos hidráulicos permitieron caracterizar la relación presión-caudal de cada implante y así introducirla en el modelo sistema-ojo en el cual los valores de presión postoperatoria (simulada) resultaron dentro de los criterios de seguridad establecidos de no-inferioridad y superioridad en hipotonía, hipertonía (1 mes), hipertonía (> 3 meses) en comparación con los estudios ABC (Budenz *et al.*, 2015).

Conclusión: El diseño de IMVALVSP1 a partir de ensayos in vitro y simulación de parámetros clínicos obtenidos de ensayos multicéntricos permiten adecuar el diseño experimental del primer ensayo clínico en pacientes con glaucoma refractario y ayudar a predecir su seguridad y eficacia.

Design of the first clinical trial of IMVALVSP1: experimental and computational method

Objectives: According to the FDA 510K Aqueous Shunts, hydraulic tests (gravity, constant flow, opening and closing), as well as a multicenter study of 50 patients are required to demonstrate the safety and efficacy of refractory glaucoma drainage implants. It is proposed in this work to carry out a design of the clinical trial of a new IMVALVSP1 drainage implant, by using a numerical simulation of it from the in vitro tests carried out.

Materials and methods: Gravity, constant flow, and opening and closing tests were performed on various devices with different valve system designs, following the FDA 510K Aqueous Shunts. A model of the implant-eye system was made following previous works (Sasseti-Guarnieri *et al.*, 2009-2014) in introducing the parameters obtained in the hydraulic tests of each implant tested.

Results: The results obtained in the hydraulic tests allowed to characterize the pressure-flow relationship of each implant and thus introduce it into the system-eye model in which, the post-operative pressure values (simulated), resulted within the established safety criteria of no inferiority and superiority in hypotonia, hypertonia (1 month), hypertonia (> 3 months) compared to ABC studies (Budenz *et al.*, 2015).

Conclusion: The design of IMVALVSP1 based on in vitro tests and simulation of clinical parameters obtained from multicenter trials allows us to adapt the experimental design of the first clinical trial in patients with refractory glaucoma, and help predict its safety and efficacy.

4

Inmunoterapia antígeno-específica para ojo seco: una estrategia terapéutica novedosa

Solana Snitman*, Alexia Vereertbrugghen, Maximiliano Miglio, Mauricio Guzmán, Carolina Maiumi Shiromizu, Irene Keitelman, Florencia Sabbione, Jeremías Galletti.

Laboratorio de Inmunidad Innata, Instituto de Medicina Experimental (CONICET-Academia Nacional de Medicina), Buenos Aires, Argentina.

*solana.snitman10@gmail.com

Objetivo: El ojo seco (OS) es una enfermedad crónica con base inflamatoria. El objetivo de este trabajo fue probar una estrategia terapéutica novedosa basada en tolerancia antígeno específica con células T regulatorias (Tregs).

Materiales y métodos: Ratones Balb/c y C57BL/6 con OS quirúrgico previamente tolerizados o no con ovalbúmina (OVA) a los que se instiló con solución salina (PBS) u OVA, y en los que se evaluó la epiteliopatía corneal como indicador principal y el reclutamiento de linfocitos T CD4+ conjuntivales.

Resultados: En los ratones tolerizados con OS, el tratamiento tópico ocular con OVA por hasta 20 días redujo la epiteliopatía corneal (PBS vs OVA, tolerización nasal: $7,2 \pm 0,12$ vs $4,8 \pm 0,60$, $p < 0,001$; tolerización conjuntival: $6,5 \pm 0,18$ vs $5,3 \pm 0,14$, $p < 0,05$). Respecto del reclutamiento de linfocitos T, se observó una tendencia hacia una menor proporción de células T CD4+ en el tratamiento con OVA (PBS vs OVA, $3,3 \pm 0,7\%$ vs $4,2 \pm 0,6\%$, $p > 0,05$) con una tendencia hacia una mayor proporción de células T CD4+ específicas para OVA (DO 11,10+) (PBS vs OVA, $15,0 \pm 7,4\%$ vs $22,8 \pm 9,6\%$, $p > 0,05$).

Conclusión: El reclutamiento de Tregs específicas para un antígeno irrelevante en la superficie ocular disminuye el daño epitelial corneal independientemente de la vía de inducción de la tolerancia mucosa. La migración de las células T CD4+

antígeno-específicas parece aumentar a expensas de las células T CD4+ potencialmente patogénicas, lo que sugiere un mecanismo de acción.

Antigen-specific immunotherapy for dry eye: a novel treatment strategy

Objective: Dry eye (DED) is a chronic inflammation-based disease. The aim of this study was to test a novel therapeutic approach based on antigen-specific tolerance with regulatory T cells (Tregs).

Methods: Balb/c and C57BL/6 mice with surgically-induced DED and previously tolerized or not with ovalbumin (OVA) were instilled with saline (PBS) or OVA, and then assessed for corneal epitheliopathy (main outcome measurement) and conjunctival CD4+ T cell recruitment.

Results: In tolerized DED mice, topical ocular OVA instillation for up to 20 days reduced corneal epitheliopathy (PBS vs OVA, nasal tolerization: 7.2 ± 0.12 vs 4.8 ± 0.60 , $p < 0.001$; conjunctival tolerization: 6.5 ± 0.18 vs 5.3 ± 0.14 , $p < 0.05$). As for T cell recruitment, we observed a tendency towards a reduced proportion of CD4+ T cells with OVA treatment (PBS vs OVA, $3.3 \pm 0.7\%$ vs $4.2 \pm 0.6\%$, $p > 0.05$) along with a tendency towards a higher proportion of OVA-specific CD4+ T cells (DO11.10+) (PBS vs OVA, $15.0 \pm 7.4\%$ vs $22.8 \pm 9.6\%$, $p > 0.05$).

Conclusion: The recruitment of Tregs specific for an antigen that is foreign to the ocular surface decreases corneal epithelial damage regardless of the route of mucosal tolerance induction. The homing of said antigen-specific CD4+ T cells to the conjunctiva seems to increase at the expense of other potentially pathogenic CD4+ T cells, thus suggesting a possible mechanism of action.

5

Resolución quirúrgica de afecciones oculares en felinos silvestres

Agustina Iaquinandí Murtagh^{1*}, Melina C. Giménez², Melisa Unger², Mariané B. Mañez³, Pablo Horacio Sande Casal¹

¹ Laboratorio de Neuroquímica Retiniana y Oftalmología Experimental, Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina (CEfyBo-CONICET), Universidad de Buenos Aires, Argentina.

² Centro de Conservación Aguará, Paso de la Patria, Corrientes, Argentina.

³ Grupo SilVetstre Argentina.

*agus_iaquinandi@hotmail.com

Objetivo: Resolver afecciones oculares en felinos silvestres, priorizando el bienestar animal con mínima intervención quirúrgica.

Materiales y métodos: Puma macho (*Puma concolor*) de 14 años y yaguaré hembra (*Panthera onca*) de 21 años, ambos parte del plantel estable del Centro de Conservación "Aguará", ubicado en Paso de la Patria, provincia de Corrientes. Bajo anestesia general se realizó un examen oftalmológico completo, se colocó una prótesis intraocular en el ojo derecho del puma y se realizó un flap pediculado en ambos ojos del yaguaré.

Resultados: En ambos casos se controló y cesó el discomfort y el dolor provocado por las afecciones oculares. En el puma también mejoró el cierre palpebral ya que se redujo el tamaño del globo ocular, logrando una dimensión similar al globo ocular contralateral. En el caso del yaguaré, se logró mantener reflejo de deslumbramiento positivo y reflejo de amenaza positivo en ambos ojos que presentaban perforación corneal secundaria a pérdida endotelial y edema corneal crónico.

Conclusión: Este es el primer caso reportado de cirugía oftalmológica en *Panthera onca* y el segundo sobre colocación de prótesis intraocular en *Puma concolor*. En función del éxito obtenido en las cirugías se sugiere que estos métodos quirúrgicos deben considerarse en especies silvestres para las que las opciones de atención postoperatoria y manejo médico son limitadas.

Surgical resolution of ocular conditions in wild felines

Objective: Surgical resolution of ocular conditions in wild felines, prioritizing animal welfare, with minimal postsurgical intervention.

Materials and methods: 14-year-old male cougar (*Puma concolor*), and 21-year-old female jaguar (*Panthera onca*), both part of the "Aguará" Conservation Center, located in Paso de la Patria, Corrientes province, Argentina. Under general anesthesia, a complete ophthalmological examination was performed, an intraocu-

lar prosthesis was placed in the right eye of the cougar and a pedunculated flap was performed in both eyes of the jaguar.

Results: In both cases, the discomfort and pain caused by eye conditions was controlled and stopped. In the cougar, the lid closure also improved as the size of the eyeball was reduced, achieving a size similar to the contralateral eyeball. In the case of the jaguar, it was possible to maintain a positive dazzle reflex and a positive reflex blink to threat reflex in both eyes that presented corneal perforation secondary to endothelial loss and chronic corneal edema.

Conclusion: This is the first case reported of ophthalmological surgery in *Panthera onca*, and the second of intraocular prosthesis placement in *Puma concolor*. Based on the surgical success obtained, it is suggested that these surgical methods should be considered in wild species for which the options for postoperative care and medical management are limited.

6

Efecto protector de derivados de membrana amniótica humana en un modelo in vitro de estrés oxidativo sobre células de epitelio pigmentario de la retina

Gastón Valverde^{1*}, Alejandro Berra^{1,2}, Ana Torbidoni^{1,2}

¹ Laboratorio Traslacional de Inmunopatología y Oftalmología, Departamento de Patología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

² Centro de Medicina Traslacional, Hospital El Cruce Néstor Kirchner, Argentina

*anavtorbi@gmail.com

Objetivos: La degeneración macular relacionada con la edad (DMAE) progresa desde etapas tempranas hasta tardías, y estas últimas son de difícil tratamiento. La membrana amniótica humana (hAM) es fuente de agentes antiinflamatorios y de factores de crecimiento, y podría ser una alternativa para su tratamiento. Nuestros objetivos fueron analizar el efecto de derivados hAM sobre la viabilidad celular y las señales inflamatorias en un modelo *in vitro* de DMAE.

Materiales y métodos: Utilizamos peróxido de hidrógeno (H₂O₂, 0,1-0,4 mM) para inducir daño oxidativo en células de epitelio pigmentario

humano (ARPE-19). Las células se pretrataron o postrataron con diferentes derivados de hAM (50 µg) durante 3 horas. Usamos tres derivados de hAM: fresca (F-hAM), liofilizada (L-hAM) y hAM homogeneizada-liofilizada (HL-hAM). La viabilidad celular se evaluó usando el ensayo de MTT y se midieron IL-6 e IL-8, usando kits de ELISA.

Resultados: El tratamiento H₂O₂ induce una reducción de la sobrevivencia celular dependiente de la concentración. Tanto el pretratamiento como el postratamiento con hAM-L y hAM-F disminuyen este efecto. El pretratamiento con hAM-F previene el efecto de la H₂O₂ incluso en la máxima concentración usada, observándose niveles de sobrevivencia celular similares a los del control sin tratamiento con H₂O₂. Observamos que IL-8 e IL-6 aumentaron con el tratamiento con H₂O₂ y ninguno de los derivados de hAM logró una reducción de estas citoquinas.

Conclusiones: Estos hallazgos demuestran que los derivados de hAM protegen a las células ARPE-19 de la reducción de la viabilidad celular inducida por H₂O₂, aunque el efecto antiinflamatorio no fue detectado.

Protective effect of human amniotic membrane derivatives in an in vitro model of oxidative stress on retinal pigment epithelium cells

Objectives: Age-related macular degeneration (AMD) progresses from early to late stages, the latter being difficult to treat. The human amniotic membrane (hAM) is a source of anti-inflammatory agents and growth factors and could be an alternative for its treatment. Our objectives were to analyze the effect of hAM derivatives on cell viability and inflammatory signals in an *in vitro* model of AMD.

Materials and methods: We used hydrogen peroxide (H₂O₂, 0.1-0.4 mM) to induce oxidative damage in human retinal pigment epithelial cells (ARPE-19). Cells were pre-treated or post-treated with different hAM derivatives (50 µg) for 3 hours. We use three derivatives of hAM: fresh (F-hAM), lyophilized (L-hAM) and homogenized-lyophilized hAM (HL-hAM). Cell viability was assessed using the MTT assay and IL-6 and IL-8 were measured, using ELISA kits.

Results: H₂O₂ treatment induces a concentration-dependent reduction in cell survival. Both pretreatment and post-treatment with hAM-L and hAM-F diminish this effect. The pretreatment with hAM-F prevents the effect of H₂O₂ even at the maximum concentration used, reaching levels of cell survival similar to those of the control without H₂O₂ treatment. We observed that IL-8 and IL-6 increased with H₂O₂ treatment and none of the hAM derivatives achieved a reduction in these cytokines.

Conclusions: These findings demonstrate that hAM derivatives protect ARPE-19 cells from H₂O₂-induced reduction in cell viability, although the anti-inflammatory effect was not detected.

7

Estudio del sistema LRP1/ α 2M durante la neovascularización coroidea

Albana Tovo^{1*}, Paula Virginia Subirada², María Victoria Vaglianti¹, José Luna Pinto³, María Cecilia Sánchez¹, Gustavo Alberto Chiabrando¹, Pablo Federico Barcelona¹

¹ Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba (CIBICI-CONICET), Córdoba, Argentina.

² Instituto Ferreyra, (INIMEC-CONICET), Universidad Nacional de Córdoba.

³ Departamento de Vítreo-Retina, Centro Privado de Ojos Romagosa, Fundación VER, Córdoba, Argentina.

*albanatovo@mi.unc.edu.ar

Objetivo: La degeneración macular relacionada con la edad (AMD) en su etapa de neovascularización coroidea (NVC) es la principal causa de pérdida de la visión en adultos. Nuestro laboratorio demostró previamente que α 2M y su receptor, LRP1, participan durante la neovascularización retinal. Además, otros autores proponen a LRP1 como un regulador de la inflamación. En este estudio, caracterizamos el proceso neovascular y el perfil proinflamatorio, poniendo énfasis en la participación de α 2M/LRP1 en la NVC.

Materiales y métodos: Se trataron ratones adultos C57BL/6 con cuatro láser de fotocoagulación por ojo. Los niveles de α 2M y LRP1 fueron analizados por WB. Después de 7 días de láser, se evaluaron los perfiles proinflamato-

rio y proangiogénico mediante qPCR. Además, se estudió la presencia de células endoteliales precursoras (CD105) por IF en el área de NV (isolectina B4) en flatmount de coroides-EPR. También se evaluaron células fagocíticas mononucleares (F4/80, Iba 1) y su expresión de LRP1 mediante microscopía confocal. Los niveles de LRP1 en microglía se confirmaron mediante citometría de flujo.

Resultados: Observamos cambios en los niveles de α 2M y LRP1 en los diferentes tiempos ensayados. Además, se observaron niveles altos de factores proinflamatorios y proangiogénicos, como así también de células mononucleares que expresan LRP1 cerca del área de CNV en la coroides-RPE a los 7 días después del láser.

Conclusiones: Nuestros resultados mostraron cambios en el nivel de α 2M y LRP1 en los animales con NVC, particularmente en las células de microglía. Futuros estudios son necesarios para determinar el rol del sistema α 2M/LRP1 en la CNV.

Study of the LRP1/ α 2M system during choroidal neovascularization

Objectives: Age-related macular degeneration (AMD) in its choroidal neovascularization (CNV) stage, is the leading cause of vision loss among adults. Our lab has previously demonstrated that α 2M and its receptor, LRP1, participate during retinal NV. Moreover, other authors propose LRP1 as a regulator of inflammatory responses. In the present study, we characterize the neovascular process and the proinflammatory profile, emphasizing on the participation of the α 2M/LRP1 system in CNV.

Materials and methods: C57BL/6 adult mice were treated with four spots of laser photocoagulation per eye. The levels of α 2M and LRP1 were analyzed by WB. After 7 days of laser, pro-inflammatory and pro-angiogenic profile was evaluated by qPCR. In addition, on the NV area in choroid-RPE flatmounts (isolectin B4) was studied the presence of precursor endothelial cell (CD105) by IF. Also, the mononuclear phagocyte cells (F4/80 and Iba 1), and his LRP1 expression was evaluated by confocal micros-

copy. Moreover, LRP1 levels on microglia were confirmed by flow cytometry.

Results: We could observe change of the $\alpha 2M$ and LRP1 protein level in CNV animals respect to control at the different time assayed. Also, high levels of both, pro-inflammatory and pro angiogenic factors, as well as an elevated number of mononuclear phagocyte cells expressing LRP1 close to the CNV area was observed in RPE-choroid 7 days post laser.

Conclusions: In sum, our results showed change of $\alpha 2M$ and LRP1 level on the CNV animals, particularly on microglia cells. Further studies are needed to determinate the role of $\alpha 2M$ /LRP1 system on the CNV.

8

SD-OCT para identificar biomarcadores preclínicos de enfermedades neurodegenerativas en la población de Argentina

Juan Ignacio Cagnasso^{1*}, Camila Fernanda Challiol¹, Waleska Berrios², Nuria Cámpora², Angel Golimstok², María Cecilia Fernández², Tomás Ortiz Basso¹.

¹ Servicio de Oftalmología del Hospital Italiano de Buenos Aires.

² Servicio de Neurología del Hospital Italiano de Buenos Aires.

*juan.cagnasso@hospitalitaliano.org.ar

Objetivo: La búsqueda de biomarcadores para la detección precoz del deterioro cognitivo leve y demencia sigue en marcha. Se ha demostrado asociación entre enfermedades neurodegenerativas con adelgazamiento de capas de fibras del nervio óptico, del espesor macular y de vasos coroideos mediante SD-OCT. El objetivo de este trabajo fue evaluar la asociación entre parámetros de SD-OCT y deterioro cognitivo.

Materiales y métodos: Realizamos un estudio observacional, analítico, de corte transversal, comparando los parámetros de SD-OCT (espesor macular y espesor coroideo) entre personas con deterioro cognitivo y un grupo control de pacientes atendidos en los servicios de Neurología y Oftalmología del Hospital Italiano de Buenos Aires entre los años 2009 y 2019. Los resultados fueron analizados mediante la prueba de Kruskal-Wallis y Wilcoxon.

Resultados: Incluimos 26 pacientes con deterioro cognitivo leve y 21 con demencia, los cuales fueron comparados con un grupo control de 30 pacientes. En la medición del espesor macular encontramos diferencias estadísticamente significativas únicamente en los cuadrantes superior de los 3 mm y en el nasal de los 6 mm, ambos en ojo derecho ($p < 0.02$), encontrando en los cuadrantes restantes valores de espesor muy similares. Tampoco pudimos hallar diferencias en el espesor coroideo entre los grupos en estudio ($p = 0,27$ en OD y $p = 0,25$ en OI).

Conclusión: En nuestro estudio no pudimos determinar la asociación del deterioro cognitivo con el adelgazamiento significativo del espesor macular coroideo, ni en estadios tempranos ni de demencia. Nos parece de relevancia plantear futuros estudios para aclarar estos resultados.

SD-OCT to identify preclinical biomarkers of neurodegenerative diseases in the Argentinian population

Objective: Preclinical diagnosis of neurodegenerative diseases is a modern medicine challenging and multiple options are being studied. Explained by the same embryological origin, an association between neurodegenerative diseases and optic nerve fiber layers, macular and choroidal thinning, was demonstrated. This study aims to identify structural biomarkers of neurodegeneration in a sample of Argentinian population.

Materials and methods: A cross-sectional study was performed, comparing SD-OCT parameters (macular and choroidal thickness) between patients with a clinical diagnosis of mild cognitive impairment or dementia and a control healthy group. The three groups were patients seen in Neurology and Ophthalmology Departments of the Hospital Italiano de Buenos Aires, between 2009 and 2019. Results were analyzed with Kruskal-Wallis and Wilcoxon tests.

Results: Twenty-six patients with mild cognitive impairment and 21 with dementia were included and compared with a control group of 30 patients. Statistically significant differences in 3 mm superior and 6 mm nasal OD quadrants

were found ($p < 0.02$). The remaining quadrants showed similar thickness values between study groups. Neither choroidal thickness presented differences ($p 0.27$ OD and $p 0.25$ OS).

Conclusion: Non association between cognitive impairment with chorioretinal thinning was demonstrated, neither in early stages, nor in advanced cases of dementia. To evaluate this association, further prospective studies should be performed.

El estrés durante la vida temprana afecta la función visual en ratones adultos

Juan Salvador Calanni*, María Florencia González Fleitas, Hernán H. Diéguez, M. Pellegrino, Agustina Iaquinandí Murtagh, María Inés Keller Sarmiento, Mónica Chianelli, Pablo Horacio Sande Casal, Damián Dorfman, Ruth Estela Rosenstein.

Laboratorio de Neuroquímica Retiniana y Oftalmología Experimental (CONICET-UBA), Buenos Aires, Argentina.

*salvadorcalanni@gmail.com

Objetivos: A influencia del estrés durante la vida temprana (EVT) sobre el desarrollo neuronal se ha estudiado intensamente en el cerebro; sin embargo, queda por explorar la influencia del EVT en la visión. En este contexto, se analizó si el EVT afecta las funciones visuales en ratones adultos.

Materiales y métodos: Ratones recién nacidos se expusieron a separación materna durante la lactancia y se destetaron tempranamente (día 17 posnatal, SMDT). Las funciones visuales se evaluaron en la edad adulta mediante pruebas de comportamiento y electroretinografía. La estructura de la retina se evaluó mediante técnicas histológicas. En el día posnatal 60 se evaluó la función visual a través de las pruebas de Looming y abismo visual.

Resultados: Los animales SMDT respondieron con menos frecuencia al estímulo de looming y mostraron menos preferencia al lado alto en el test del abismo visual en comparación con los animales control. Los animales expuestos a SMDT no mostraron cambios en la amplitud y latencia de las ondas a y b del electroretinograma, en tanto que la respuesta de umbral escotópico y la res-

puesta fotópica negativa (índices de la función de las células ganglionares) disminuyeron significativamente en comparación con los animales control. Concomitantemente, se observó un menor número de células Brn3a (+) y menores niveles de sinaptofisina en la capa plexiforme interna.

Conclusión: En conjunto, nuestros resultados indican que el EVT provoca cambios perjudiciales en las funciones visuales tales como la agudeza visual y la percepción de profundidad, que correlacionan con alteraciones estructurales en la retina interna de ratones adultos.

Early life stress affects visual function in adult mice

Objective: Developmental events during early life are sensitive to environmental information. Early life stress (ELS) influence on neural development has been intensively studied in central areas of the brain; nevertheless, ELS influence on vision remains to be explored. In this context, our aim was to assess if ELS affects visual functions in adult mice.

Materials and methods: Newborn mice were exposed to maternal separation during lactation and early weaning (at postnatal day 17, MSEW). Visual functions were evaluated in adulthood by behavioral tests and electroretinography. Retinal structure was evaluated by histological techniques. At postnatal day 60, visual functions were evaluated through the looming test, and the cliff avoidance test.

Results: MSEW animals responded less frequently to the looming stimulus, and showed less side preference in the cliff avoidance test, as compared to control animals. MSEW exposed mice showed no changes in the electroretinogram a- and b-wave amplitude and latency, whereas the negative scotopic threshold response and the photopic negative response (indexes of retinal ganglion cell function) were significantly decreased as compared to control mice. Hand in hand with these results, histological studies showed a lower number of Brn3a (+) cells, and lower synaptophysin levels in the anterior plexiform layer.

Conclusion: Altogether, our data indicate that ELS causes detrimental changes in visual func-

tions, such as reduced visual acuity and impaired depth perception, which correlate with structural alterations in the anterior retina of adult mice.

10

Las isoformas clásicas de la fosfolipasa D y el estrés oxidativo en las células del epitelio pigmentario de la retina expuestas a altas concentraciones de glucosa

María Sol Echevarría*, Paula Estefanía Tenconi, Vicente Bermúdez, Melina V. Mateos

Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca (INI-BIBB-CONICET), Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia (DBByF), Universidad Nacional del Sur (UNS), Bahía Blanca, Argentina.

*mariasolechevarria@gmail.com

Objetivo: La inflamación y el estrés oxidativo (OE) están involucrados en la fisiopatología de diversas enfermedades degenerativas de la retina, tales como la retinopatía diabética y la degeneración macular asociada a la edad. Resultados previos de nuestro laboratorio demostraron que las fosfolipasas D clásicas (PLD1 y PLD2) se activan y median la respuesta inflamatoria en las células del epitelio pigmentario (RPE) expuestas a lipopolisacárido y a altas concentraciones de glucosa (HG). Asimismo, en ambos modelos de injuria inflamatoria observamos el aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS). El objetivo del presente trabajo es evaluar la relación entre el OE y la activación de las PLDs observados en las células del RPE expuestas a HG.

Materiales y métodos: Las células del RPE (ARPE-19) se expusieron a HG (33 mM) o a concentraciones de normoglucemia (NG, 5.5 mM) por 24 horas. La generación de ROS se evaluó utilizando la sonda DCDCDHF (diclorodihidrofluoresceína diacetato). Para estudiar el rol de las PLD las células se incubaron con los inhibidores farmacológicos selectivos para PLD1 (VU0359595) y para PLD2 (VU0285655-1).

Resultados: En las células ARPE-19 expuestas a HG se observó un aumento en los niveles de ROS. La incubación con los inhibidores de

PLD1 y PLD2 previno la generación de OE en las células del RPE expuestas a HG.

Conclusiones: Estos resultados preliminares sugieren que la inhibición farmacológica de PLD1 y PLD2 sería capaz de prevenir no solo la respuesta inflamatoria, sino también el OE inducido por las altas concentraciones de glucosa en las células del RPE.

Classical phospholipase D isoforms and oxidative stress in retinal pigment epithelium cells exposed to high glucose concentration

Objective: Inflammation and oxidative stress (OE) are involved in the pathogenesis of several degenerative retinal diseases, such as diabetic retinopathy and age-related macular degeneration. Previous results from our laboratory demonstrated that classical phospholipase D isoforms (PLD1 and PLD2) are activated and mediate the inflammatory response of retinal pigment epithelium (RPE) cells exposed to lipopolysaccharide (LPS) and high glucose concentrations (HG). Furthermore, an increase in reactive oxygen species (ROS) levels was observed in RPE cells exposed to both inflammatory stimuli. The aim of the present work was to study the relationship between OE and PLD activation observed in RPE cells exposed to HG.

Materials and methods: RPE cells (ARPE-19) were exposed to HG (33 mM) or to glucose concentrations corresponding to normoglycemia (NG, 5.5 mM) for 24 hours. ROS generation was evaluated using the probe DCDCDHF (dichlorodihydrofluorescein diacetate). To study the role of PLDs cells were incubated with selective pharmacological inhibitors for PLD1 (VU0359595) and PLD2 (VU0285655-1).

Results: In ARPE-19 cells exposed to HG an increase in ROS levels was observed. The incubation with PLD1 and PLD2 inhibitors prevented OE generation in RPE cells exposed to HG.

Conclusions: These preliminary results suggest that pharmacological PLD1 and PLD2 inhibition is able not only to prevent the inflammatory response, but also OE induced by HG in RPE cells.

Microscopía confocal y evaluación del tiempo de vida de fluorescencia (FLIM) para el análisis de tejidos oculares: estudio exploratorio *ex-vivo*

Lucía Domínguez Lucía^{1*}, Rodrigo M. Torres^{2,3}, Juan Etchart^{1,4}, Luciano Peretti⁴, Javier Adur^{1,4}

¹ Instituto de Investigación y Desarrollo en Bioingeniería y Bioinformática (IBB-CONICET), Universidad Nacional de Entre Ríos, Oro Verde, Entre Ríos, Argentina.

² Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Entre Ríos, Oro Verde, Entre Ríos, Argentina.

³ ROMAT Creator Center, Colonia Avellaneda, Entre Ríos, Argentina.

⁴ Laboratorio de Microscopía Aplicada a Estudios Moleculares y Celulares (LAMA), Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Entre Ríos, Oro Verde, Entre Ríos, Argentina.

*lu_dominguez21@hotmail.com

Objetivo: Estandarizar un método para la evaluación de la retina de ratones, procesando y analizando imágenes de intensidad y de tiempos de vida de la fluorescencia.

Materiales y métodos: Se utiliza un microscopio de barrido láser confocal (CLSM) LSM880 (Carls Zeiss, Alemania). Las imágenes fueron capturadas con diferentes lentes objetivas, láser de 633 nm y para el estudio del tiempo de vida se utilizaron las líneas de láser pulsado de 405 y 440 nm. Las imágenes fueron capturadas con detectores GaAsP PMT por la metodología de conteo de fotones únicos (Becker & Hickl, Alemania). Se utilizaron ratones de la cepa BALBc que, tras su eutanasia, fueron enucleados utilizando utratras tijeras curvas. El globo ocular se colocó en alcohol 70% y posteriormente en solución fisiológica. Las visualizaciones fueron mediante microscopía del globo ocular completo (transcorneal/transescleral) y mediante seccionamiento.

Resultados: Por microscopía transcorneal se obtuvieron imágenes pura y exclusivamente de estructuras corneales sin lograr la penetración adecuada de los láseres hacia la retina. Por microscopía transescleral se obtuvo la visualización de vascularización escleral. Por seccionamiento del globo ocular se obtuvieron imágenes del epitelio pigmentario de la retina. En FLIM se identificaron diferentes estructuras como vasos, fibras y nervios.

Conclusiones: Se detectaron capacidades y limitaciones del equipo utilizado y se estandarizó un método de trabajo. Los resultados obtenidos son prometedores para desarrollar un método que permita evaluar la retina por técnica de microscopía láser confocal y FLIM en la retina de ratones *in vivo*.

Confocal microscopy and fluorescence-lifetime imaging microscopy (FLIM) for the ocular tissues evaluation: an *ex-vivo* exploratory study

Objective: To standardize a method for the evaluation of the mouse retina, processing and analyzing imaging of intensity and lifetime fluorescence.

Methods: A scanning laser confocal microscopy (CLSM) LSM880 (Carls Zeiss, Alemania) was used. Images were obtained by lenses of different objectives and the selected laser was 633 nm. For the lifetime evaluation, pulsed lasers of 405 and 440 nm were used. Images were taken with GaAsP PMT detectors by the methodology of single photons counting (Becker & Hickl, Alemania). BALBc mice were used. After euthanasia, they were enucleated with the aid of curved scissors. The ocular globe was placed in alcohol 70% and physiological solution. Visualizations were obtained by microscopy of the entire ocular globe (transcorneal/transscleral) and by slices sections.

Results: By transcorneal microscopy only was obtained imaging information of corneal structures and was not possible to get adequate laser penetration to get retinal information. By transscleral microscopy it was possible to get information on scleral vascular structures. By slices sections of the globe was obtained imaging of the retinal pigment epithelium. With FLIM technique has been identified structures as vessels, collagen fibers, and nerves.

Conclusions: Strengths and limitations of the equipment used were found and it was standardized a method of work. The obtained results are promising to develop a method of exploring the retina *in vivo*, by confocal laser microscopy and FLIM technique.

Evaluación de la concordancia entre dos técnicas de pupilometría cromática en el régimen temporal

Constanza Tripolone¹, Luis Issolio^{1,2}, Carlos Agüero³, Alejandro Lavaque³, Pablo Barrionuevo^{1*}

¹ Instituto de Investigación en Luz, Ambiente y Visión (II-LAV-CONICET), Universidad Nacional de Tucumán, San Miguel de Tucumán, Argentina.

² Departamento de Luminotecnia, Luz y Visión, Facultad de Ciencias Exactas y Tecnología, Universidad Nacional de Tucumán, San Miguel de Tucumán, Argentina.

³ Centro de Especialidades Oftalmológicas, San Miguel de Tucumán, Argentina.

* pbarrionuevo@herrera.unt.edu.ar

Objetivo: Evaluar si los parámetros del reflejo pupilar a la luz obtenidos por estímulos de pulso en el tiempo (pPLR) concuerdan con los obtenidos por estímulos de parpadeo (fPLR).

Materiales y métodos: Se utilizó un sistema fotoestimulador de visión Maxwelliana para generar estímulos azul, rojo y blanco, para cuatro amplitudes de intensidades (10%, 20%, 35%, 50%) respecto de un fondo de adaptación inicial. Para el fPLR se utilizaron estímulos sinusoidales de 1Hz. Para el pPLR, pulsos rectangulares. Se registró el diámetro pupilar de tres observadores con visión normal que se preadaptaron a la oscuridad durante 5 minutos y luego se adaptaron al color del estímulo durante 60 segundos. Para comparar los parámetros de pPLR y fPLR se calcularon la diferencia absoluta entre estos y el índice de “variación de concordancia” (VC). Los parámetros considerados fueron constricción inicial, tiempo al mínimo y plateau.

Resultados: Para la respuesta en estado estacionario (*plateau*) se encontró un comportamiento similar para pPLR y fPLR según VC, particularmente para una amplitud del 35%, donde se encontraron pequeñas diferencias en los parámetros para todos los colores. De los parámetros transitorios (constricción inicial y tiempo a mínimo) se demostró que existe una respuesta mayor y más lenta de pPLR respecto a fPLR, lo que se evidencia en las altas variaciones para estos parámetros.

Conclusión: Se evaluó la concordancia entre las respuestas pupilares pulsada y parpadeante. Se encontraron condiciones de estímulo donde los parámetros de las respuestas pulsadas se podían estimar analizando los mismos parámetros para las respuestas de parpadeo.

Agreement assessment between two chromatic pupillometry techniques in the temporal

Objective: To assess how well the parameters of the pupil light reflex obtained by pulse stimulus (pPLR) agree with those obtained by flickering stimulus (fPLR).

Materials and methods: A Maxwellian view photostimulator system was used to generate blue, red and white stimuli for four different intensities amplitudes (10%, 20%, 35%, 50%) with respect to an initial light-adapting background. For the fPLR, sinusoidal stimuli of 1Hz were used. For the pPLR, the stimuli were rectangular pulses. Pupil diameter of three observers' were recorded. The observers dark-adapted for 5 minutes. After that, they light-adapted for 60 secs at the color of the test stimulus. To compare parameters of pPLR and fPLR, we computed the difference in absolute terms of both and the “agreement variation” index (AV). The parameters considered were initial constriction, time to minimum and plateau.

Results: For the steady-state response (*plateau*) similar behavior for pPLR and fPLR was found according the agreement variation, particularly for a stimulation amplitude of 35%, in which small parameter differences were found all color stimuli. From transient parameters (initial constriction and time to minimum), it was shown that there is a higher and slower response of pPLR with respect to fPLR, which is evidenced in the high variations for these parameters.

Conclusion: The agreement between pulsed and flickering pupil responses were assessed. It was found that there were stimuli conditions where parameters of pulsed responses could be estimated analyzing same parameters for flickering responses.

La neuroinflamación dependiente de TRPV1 contribuye a la disfunción nerviosa corneal en el ojo seco

Alexia Vereertbrugghen*, Maximiliano Miglio, Solana Snitman, Carolina Maiumi Shiromizu, Irene Keitelman, Florencia Sabbione, Jeremías Galletti

Laboratorio de Inmunidad Innata, Instituto de Medicina Experimental (CONICET-Academia Nacional de Medicina), Buenos Aires.

*ale.vereert@gmail.com

Objetivo: El daño nervioso corneal está ampliamente descrito en el ojo seco (OS) pero se desconoce cómo ocurre y su rol en la fisiopatología. El objetivo de este trabajo fue determinar si la neuroinflamación es relevante en el OS.

Métodos: Modelos de OS quirúrgico uni- y bilateral para observar el efecto inflamatorio en ausencia de estrés de desecación en el ojo contralateral y el rol del nociceptor polimodal TRPV1, respectivamente. Se evaluó la tolerancia mucosa ocular, epitelopatía corneal (EC, por tinción con fluoresceína), sensibilidad mecánica (SM), apertura palpebral (ECR), sensibilidad a capsaicina (SC, agonista TRPV1) y la morfología de las terminales nerviosas corneales intraepiteliales (TNIE).

Resultados: Los ojos contralaterales de ratones con OS unilateral mostraron una menor SM ($n = 62$, día > 4, $p < 0,05$), ECR ($n = 9$, día > 7, $p < 0,05$) y SC ($n = 9$, día > 4, $p < 0,05$) y una mayor EC ($n = 9$, día > 4, $p < 0,05$) respecto de los controles y perdieron la tolerancia mucosa posteriormente (día 8). Los ratones con OS bilateral que recibieron diariamente un antagonista TRPV1 mostraron un OS menos severo con respecto de EC ($n = 20$, $p < 0,05$) y ECR ($n = 9$, $p > 0,05$) y también mayor densidad de TNIE ($n = 11$, $p < 0,05$).

Conclusión: La neuroinflamación causada por el OS contribuye al daño nervioso corneal y probablemente a la fisiopatología de la enfermedad, en parte por un mecanismo que involucra la señalización por TRPV1. Estos hallazgos podrían tener implicancias terapéuticas.

TRPV1-dependent neuroinflammation contributes to corneal nerve dysfunction in dry eye disease

Objective: Corneal nerve damage is widely described in dry eye disease (DED) but how it comes about and its role in pathophysiology remain unknown. The aim of this work was to evaluate if neuroinflammation is relevant in DED.

Methods: Uni- and bilateral surgical DED models to observe the inflammatory effect in the absence of desiccation stress in the contralateral eye and the role of the polymodal nociceptor TRPV1, respectively. Ocular mucosal tolerance, corneal epitheliopathy (CE, by fluorescein staining), mechanical sensitivity (SM), eye-closing ratio (ECR), capsaicin sensitivity (SC, TRPV1 agonist), and corneal intraepithelial nerve ending (TNIE) morphology were evaluated.

Results: The opposite eyes of mice with unilateral DED showed lower SM ($n = 62$, day > 4, $p < 0.05$), ECR ($n = 9$, day > 7, $p < 0.05$) and SC ($n = 9$, day > 4, $p < 0.05$) and higher CS ($n = 9$, day > 4, $p < 0.05$) compared with sham-surgery eyes, and they lost mucosal tolerance later on (day 8). Mice with bilateral DED that received TRPV1 antagonist treatment daily developed milder disease with respect to EC ($n = 20$, $p < 0.05$) and ECR ($n = 9$, $p > 0.05$), and also had higher TNIE density ($n = 11$, $p < 0.05$).

Conclusion: Neuroinflammation caused by DED contributes to corneal nerve damage and probably to the pathophysiology of the disease, in part by a mechanism involving TRPV1 signaling. These findings could have therapeutic implications.

El receptor A2A de adenosina: un nuevo blanco terapéutico en la degeneración de la retina inducida por iluminación

Manuel Soliño¹, Ignacio M. Larrayoz², Ester María López^{1S}, Manuel Rey-Funes¹, Mariana Bareiro¹, Cesar Fabián Loidl¹, Elena Girardi¹, Alfredo Martínez³, Juan José López-Costa^{1*}

¹ Instituto de Biología Celular y Neurociencia "Prof. E. De Robertis" (IBCN-CONICET), Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

² Biomarkers and Molecular Signaling Group, Center for Biomedical Research of La Rioja (CIBIR), Logroño, España.

³ Angiogenesis Study Group, Center for Biomedical Research of La Rioja (CIBIR), Logroño, España.

^S Falleció en febrero 2021. Este trabajo es un homenaje en su memoria.

*jjlopez@fmed.uba.ar

Objetivos: El propósito de este trabajo fue evaluar el potencial efecto neuroprotector de la modulación del receptor de adenosina A2A en el modelo de degeneración de la retina inducida por la luz, que se asemeja en muchas de sus características a la degeneración macular relacionada con la edad.

Materiales y métodos: Se inyectaron ratas Sprague Dawley en forma intravítrea en el ojo derecho con CGS 21680 (agonista A2AR) o SCH 58261 (antagonista A2AR). Los ojos contralaterales se inyectaron con los vehículos respectivos como control. Luego las ratas se sometieron a iluminación continua (12.000 lux) durante 24 horas. Las retinas se procesaron mediante inmunohistoquímica GFAP, técnica de TUNEL, Western blot (WB) y qRT-PCR. Otro grupo de ratas fue sometido a estudios de electroretinografía (ERG).

Resultados: Los animales tratados con CGS21680 mostraron un aumento significativo de núcleos apoptóticos en la capa nuclear externa (ONL) y un aumento significativo del área inmunorreactiva de GFAP de sus retinas, pero no se alteraron los resultados de WB y ERG. La qRT-PCR reveló que aumentó significativamente la expresión de IL1 β . Por el contrario, SCH 58261 disminuyó significativamente los núcleos apoptóticos y el área inmunorreactiva para GFAP en la ONL. También disminuyó significativamente los niveles de GFAP y caspasa-3 activa en WB, y conservó la función de la retina. La qRT-PCR reveló que disminuyó significativamente la expresión de TNF α .

Conclusión: El bloqueo de A2AR antes del inicio del proceso patogénico es neuroprotector y el uso de antagonistas del receptor A2A merece ser considerado en enfermedades degenerativas de la retina.

Adenosine A2A receptor: a new neuroprotective target in light induced retinal degeneration inducida por iluminación

Objectives: The aim of this work was to evaluate the potential neuroprotective effect of the modulation of adenosine A2A receptor in the model of light induced retinal degeneration which resembles many characteristics of human

degenerative diseases of the outer retina as age-related macular degeneration.

Materials and methods: Sprague Dawley rats were intravitreally injected in the right eye with either CGS 21680 (A2AR agonist) or SCH 58261 (A2AR antagonist). Contralateral eyes were injected with respective vehicles as control. Then, rats were subjected to continuous illumination (12,000 lux) for 24 hours. Retinas were processed by GFAP immunohistochemistry (IHC), TUNEL technique, Western blotting (WB) and qRT-PCR. Another group of rats was subjected to functional studies by electroretinography (ERG).

Results: Animals treated with CGS21680 showed a significant increase of apoptotic nuclei in outer nuclear layer (ONL) and a significant increase of GFAP immunoreactive area of the retinas, but did not alter WB and ERG results. qRT-PCR revealed that CGS 21680 significantly increased the expression of IL1 β . On the opposite, SCH 58261 significantly decreased apoptotic nuclei in ONL and GFAP immunoreactive area of the retinas. It also significantly decreased GFAP and activated Caspase-3 levels in WB, and preserved retinal function. qRT-PCR revealed that SCH 58261 significantly decreased the expression of TNF α .

Conclusion: These results show that the blockage of A2AR before the start of the pathogenic process is neuroprotective as it prevents light induced retinal damage. The use of A2A receptor antagonists deserves to be considered in retinal degenerative diseases.

Desarrollo y caracterización de implantes intracamerales biodegradables cargados con fármacos

Pablo Miranda^{1*}, Helena Pardo^{1,3}, Analía Castro¹, Juan Pablo Villanueva¹, Santiago Palma³, Luciana Pereira¹, Patricia Zimet¹, Álvaro W. Mombrú³, Ignacio Tártara²

¹ Centro Nanomat, Instituto Polo Tecnológico de Pando, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

² Unitefa, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

³ Cátedra de Física, DETEMA, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

*ps.miranda.f@gmail.com

Objetivo: Fabricar, caracterizar y evaluar implantes intracamerales biodegradables conteniendo una combinación de un antibiótico (clorhidrato de moxifloxacina, MOX HCl) y un corticosteroide (dexametasona, DEX) como ingredientes activos para tratamiento y/o prevención de endoftalmitis bacteriana e inflamación posquirugía de cataratas.

Materiales y métodos: La producción se llevó a cabo mediante la tecnología de extrusión en caliente, empleando un equipo Pharma 11 (Thermo Fisher Scientific, Alemania). La novedosa formulación desarrollada consistió en una mezcla de 3 componentes. Dexametasona (Zhejiang Xianyu Pharmaceutical, China) y Clorhidrato de moxifloxacina (Shreeji Pharma International, India) fueron los ingredientes activos empleados, mientras que PLGA (Evonik Industries, Alemania) se utilizó como matriz. La formulación y su composición se ajustaron aplicando la metodología sistemática QbD y la fabricación de los implantes fue guiada por un enfoque de diseño experimental. A su vez, se adaptaron procedimientos de control de calidad sobre procesos y producto terminado, y se analizó el perfil de liberación *in vitro* de los insertos. Por último, se efectuaron estudios de caracterización empleando diversas técnicas instrumentales.

Resultados: Ambos fármacos mostraron perfiles de liberación sostenida *in vitro*, con una tasa de entrega en 10 días de estudio de aproximadamente 80 y 700 µg para DEX y MOX HCl respectivamente, alcanzándose concentraciones terapéuticas en 24 horas.

Conclusiones: Se logró obtener un inserto apto para uso en cámara anterior, presentando un prometedor perfil de liberación de fármacos que lo posiciona como una posible alternativa hacia la solución de los problemas de adhesión al tratamiento por gotas oftálmicas y de los daños causados por múltiples inyecciones intracamerales.

Development and characterization of drug loaded biodegradable intracameral implants

Objective: Manufacturing characterization and evaluation of intracameral biodegradable implants containing a combination of an anti-

biotic (moxifloxacin hydrochloride, MOX HCl) and a corticosteroid drug (dexamethasone, DEX) as active ingredients, for the treatment and/or prevention of bacterial endophthalmitis and inflammation post cataract surgery.

Materials and methods: The production was carried out by hot melt extrusion technology in a Pharma 11 device (Thermo Fisher Scientific, Germany). The simple formulation developed consisted on a mixture of 3 components. Dexamethasone (Zhejiang Xianyu Pharmaceutical, China) and Moxifloxacin Hydrochloride (Shreeji Pharma International, India) were the active ingredients used, whereas PLGA (Evonik Industries, Germany) was the matrix material. The formulation and its composition were adjusted applying the QbD systematic methodology, and the implants production was guided by an experimental design approach. Quality control methods for raw materials and final product were also developed, and the *in vitro* profile of the inserts was analyzed. Finally, characterization studies were performed using different instrumental techniques.

Results: Both drugs displayed sustained release *in vitro* profiles with a total delivery rate in a 10 days study of approximately 80 and 700 µg for DEX and MOX HCl respectively, reaching therapeutic concentrations within 24 hours.

Conclusions: An adequate insert for the anterior chamber was obtained, with a promising release profile making it a possible alternative towards the solution of ophthalmic drops patient compliance issues, and damages caused by multiple intracameral injections.

Las células gliales de Müller como nuevos componentes fotosensibles en la retina interna de los vertebrados

Natalia A. Marchese*, Maximiliano N. Ríos, Mario E. Guido. CIQUIBIC-CONICET, Departamento de Química Biológica Ranwel Caputto, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

*natalia.marchese@unc.edu.ar

Objetivo: Circuitos locales de la retina interna de vertebrados regulan funciones no asociadas a

la formación de imágenes que implican la detección de las condiciones de iluminación ambiental a lo largo del día en el espectro del azul-UV por acción de opsinas y células fotorreceptoras no canónicas. Nuestros estudios recientes se centran en las respuestas impulsadas por luz en células gliales de Müller (CM).

Materiales y métodos: Cultivos primarios de CM de retinas de pollo embrionarias (E8) fueron estimulados con luz azul (LA, 480 nm). Posteriormente se realizaron determinaciones bioquímicas y microscopía de fluorescencia para la detección de calcio.

Resultados: Las CM en cultivo expresan Opn3 y su expresión y localización está regulada por LA. Además, identificamos una respuesta fótica directa de las CM a un pulso de LA observada como un aumento de los niveles de calcio intracelular. Esta respuesta dura varios minutos, depende de la activación de opsinas, es específica a LA y comprende tres subpoblaciones: a) aumento \geq 20%, b) aumento 10-20%, c) ningún aumento. Nuestros resultados recientes, modificando la disponibilidad de calcio de distintos compartimentos celulares, indican que la activación de las CM implica la liberación de calcio desde depósitos intracelulares. De hecho, el aumento del calcio citosólico en CM va acompañado de una disminución de calcio en el retículo endoplásmico.

Conclusiones: Las CM son nuevos componentes intrínsecamente fotosensibles en la retina interna de vertebrados, potencialmente contribuyendo a los circuitos locales en la regulación de varios procesos fisiológicos por LA.

Müller glial cells as novel photosensitive components in the vertebrate inner retina

Objective: Local circuits in the inner retina of vertebrates drive specific non-image forming functions (NIF) by sensing the environmental lighting conditions along the day in the blue-UV spectrum by non canonical opsins and photoreceptor cells. Our recent studies in the understanding of NIF are focused on light-driven responses of Müller glial cells (MC).

Materials and methods: Primary cultures of MC from embryonic chicken retinas (E8) kept for two

weeks were stimulated with blue light (BL, 480 nm LED of 85 μ W/cm²). Afterwards, biochemical determinations and calcium fluorescence microscopy were performed.

Results: MC in culture express Opn3 and its expression and location is photic-regulated by BL and dependent on protein synthesis. Moreover, we identified a direct photic response of MC to a BL pulse observed as an increase in intracellular calcium levels. This response is sustained for several minutes, dependent on opsin activation, specific to BL stimulation and comprises three subpopulations: a) \geq 20% increase, b) 10-20% increase, and c) no increase. Our recent results indicate that MC activation involves calcium release from intracellular stores as their depletion decreased the percentage of MC effectively responding to BL whereas the presence of an extracellular calcium chelator did not. Indeed, cytosolic calcium increase in MC goes along with a decrease in levels of calcium in the endoplasmic reticulum.

Conclusions: MC can be postulated as new intrinsically photosensitive components in the inner retina of vertebrates potentially contributing to local circuits in the regulation of various physiological processes by BL.

Efecto del desbalance metabólico sobre la capacidad de reprogramación de las células retinales de Müller: participación de la desacetilasa de histonas SIRT6

Francisco Sanhueza Salas^{*1}, Alfredo García Venzor^{2,3}, Natalia Beltramone⁴, Claudia Capurro⁴, Deborah Toiber^{2,3}, Dafne Magalí Silberman¹

¹ Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFY-BO-UBA-CONICET), Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

² Department of Life Sciences, Ben-Gurion University of the Negev, Beer Sheva, Israel.

³ The Zlotowski Center for Neuroscience, Ben-Gurion University of the Negev, Beer Sheva, Israel.

⁴ Departamento de Ciencias Fisiológicas, Laboratorio de Biomembranas, Instituto de Fisiología y Biofísica "Bernardo Houssay" (IFIBIO-HOUSSAY-CONICET), Universidad de Buenos Aires, Argentina.

*l.sanhueza05@gmail.com

Objetivos: 1) Estudiar el efecto de las variaciones de glucosa y el estrés oxidativo sobre la capa

cidad de reprogramación de las células de Müller (CMs) y analizar la participación del modulador de la homeostasis de la glucosa, la desacetilasa de histonas SIRT6, como un posible regulador epigenético de este proceso. 2) Evaluar el perfil de expresión genético de células de Müller de un modelo murino de diabetes.

Materiales y métodos: La línea celular MIO-M1 fue cultivada con diferentes concentraciones de glucosa y condiciones de estrés oxidativo (H₂O₂) para determinar indicadores moleculares de dediferenciación (niveles de glutamina sintetasa, GS), reprogramación (SOX9) y niveles de SIRT6. La capacidad de migración se analizó por el ensayo de reparación de la herida. Se validaron los resultados en retinas de ratones con una delección condicional de SIRT6 en el SNC (Nes-Cre^{-/-}). Se utilizó una base de datos publicada generada a partir de CMs de ratas diabéticas vs controles sanos para realizar un análisis de expresión genética diferencial, un estudio de ontología genética y de enriquecimiento de factores de transcripción.

Resultados y conclusión: Encontramos que *in vitro* el desbalance metabólico induciría algún grado de dediferenciación (disminución de GS), permitiría la adquisición de un fenotipo pluripotente (aumento de SOX9), favorecería la migración de las CMs y que SIRT6 modularía este proceso. El análisis de enriquecimiento mostró una expresión diferencial de genes en categorías relacionadas a metabolismo, migración celular y pluriopotencialidad. Varias categorías funcionales afectadas están directamente relacionadas a la función de SIRT6. Identificamos 67 potenciales factores de transcripción, incluyendo SOX9, que podrían ser responsables de los cambios transcripcionales observados en CMs de animales diabéticos. La heterogeneidad de la respuesta de las CMs a un desafío metabólico *in vivo* revela la participación de otras vías de regulación que ejercerían efectos inhibitorios opuestos previniendo que las CMs adopten un fenotipo de reprogramación en condiciones fisiológicas.

Metabolic imbalance effect on the reprogramming capacity of retinal Müller cells: involvement of histone deacetylase SIRT6

Objectives: 1) To study the effect of glucose variations and oxidative stress in Müller cells (MGs) reprogramming capacity and analyze the participation of a key glucose homeostasis modulator, histone deacetylase SIRT6, as a potential epigenetic regulator of this process. 2) To evaluate the gene expression profile of Müller cells (MGs) from a murine model of diabetes.

Material and methods: The MIO-M1 cell line was cultured under different glucose concentrations and oxidative stress conditions (H₂O₂) to determine molecular indicators of dedifferentiation (levels of glutamine synthetase), reprogramming (SOX9) and levels of SIRT6. The migration capacity was analyzed by the wound healing assay. Results were validated in retinas from mice with a conditional deletion of SIRT6 in the CNS (Nes-Cre^{-/-}). A published transcriptional profile dataset generated by using MGs from diabetic rats vs healthy controls was used to determine differentially expressed genes and to perform gene ontology and transcription factor enrichment analysis.

Results and conclusion: We found that metabolic impairment would induce some degree of dedifferentiation (decrease of glutamine synthetase), allow the acquisition of a pluripotent phenotype (increase of SOX9) and favor the migration capacity of MGs *in vitro* and that SIRT6 may play a role as a modulator of this process. Enrichment analysis showed differentially expressed genes in categories related to metabolism, cell migration and pluripotency. Many functional categories affected in these cells were directly related to SIRT6 function. We identified 67 predicted transcription factors, including SOX9, that could be responsible for the transcriptional changes observed in diabetic MGs. The heterogeneity of Müller cells response to a metabolic def^y *in vivo*, reveals that other regulatory pathways that exert opposite inhib-

itory effects may be involved, preventing MGs to adopt a fully reprogramming phenotype in physiological conditions.

18

Perfil lipídico diferencial de pterigión de pacientes con diferente grado de exposición a radiación ultravioleta

María Fernanda Suárez,^{1*} M. C. Piqueras^{2§}, Esteban Medina³, Juan López³, Mariano Irós³, Sanjoy Bhattacharya², Horacio Marcelo Serra¹

[§] Los dos primeros autores contribuyeron igualmente en este trabajo.

¹ Centro de Investigación en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI-CONICET), Departamento Bioquímica Clínica, Facultad Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

² Bascom Palmer Eye Institute, University of Miami, Miami, Estados Unidos.

³ Instituto de Microcirugía Ocular Córdoba (IMOC), Argentina.
*mf.suarez10@gmail.com

Objetivos: El pterigión se caracteriza por el crecimiento anormal de tejido epitelial y fibrovascular desde el limbo esclerocorneal que invade la córnea. El propósito del estudio es comparar el perfil lipídico de pacientes con pterigión avanzado cuya actividad laboral implica exposición mayor de tres horas a radiación ultravioleta B (RUVB⁺⁺⁺) versus aquellos con menor exposición (RUVB^{+/-}).

Métodos: Se extrajeron tejidos conjuntivales de zonas afectadas y no afectadas (controles) de pacientes con pterigión avanzado sin otras enfermedades de la superficie ocular. Todos los procedimientos se sujetaron a la declaración de Helsinki. Los lípidos se extrajeron empleando el método de Bligh y Dyer modificado. El análisis de lípidos se realizó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) junto con espectrometría de masas de alta resolución en tándem (LC-MS/MS). Para el análisis bioinformático se utilizó Thermo Scientific™ LipidSearch™ Software.

Resultados: Se identificaron 29 clases y 775 especies lipídicas en muestras de RUVB⁺⁺⁺, RUVB^{+/-} y controles. El lípido más abundante fue fosfatidilcolina. Se encontró mayor abundancia relativa del ácido graso (O-acil)-1-hidroxi y cardiolipinas en RUVB⁺⁺⁺ y RUVB^{+/-} respecto de controles. Colesteril éster está 2,44 veces

incrementado en RUVB⁺⁺⁺ vs RUVB^{+/-} y es 11,76 veces más abundante en RUVB⁺⁺⁺ vs control. Los triglicéridos están 5,5 veces disminuidos en RUVB^{+/-} vs control. Las clases lisofosfatidilcolina, lisofosfatidiletanolamina, lisofosfatidilglicerol y lisodimetilfosfatidiletanolamina están ≈ 1,5 veces disminuidas en RUVB⁺⁺⁺ y RUVB^{+/-} respecto de sus controles.

Conclusión: Mediante el uso de HPLC y LC-MS/MS se encontró una diferencia significativa en el perfil lipídico de pacientes con pterigión RUVB⁺⁺⁺ respecto a RUVB^{+/-}.

Differential lipid profile in pterygium patients with different exposure levels to ultraviolet radiation

Purpose: Pterygium is characterized by abnormal growth of epithelial and fibrovascular tissue from the esclerocorneal limbus invading the cornea. The objective of the study is to compare the lipidomic profile from patients with advanced pterygium whose work activity involves exposure for more than three hours to ultraviolet B radiation (UVRB +++), versus those with less exposure (UVRB +/-).

Methods: Conjunctival tissues from affected and unaffected areas (controls) were extracted from patients with advanced pterygium without other ocular surface diseases. All procedures were in accordance to the Declaration of Helsinki. Lipids were extracted using the modified Bligh and Dyer method. Lipid analysis was performed by high performance liquid chromatography (HPLC), together with high resolution tandem mass spectrometry (LC-MS / MS). Thermo Scientific™ LipidSearch™ Software were used for bioinformatic analysis.

Results: 29 classes and 775 lipid species were identified in RUVB +++, RUVB +/- and control samples. The most abundant lipid was phosphatidylcholine. A greater relative abundance of fatty acid (O-acyl) -1-hydroxy and cardiolipins was found in RUVB +++ and RUVB +/- with respect to controls. Cholesteryl ester is 2.44 times increased in RUVB +++ vs RUVB +/- and it is 11.76 times more abundant in RUVB +++ vs control. Triglycerides are 5.5 times decreased in RUVB +/- vs control. The lysophosphatidylcho-

line, lysophosphatidylethanolamine, lysophosphatidylglycerol, and lysodimethylphosphatidylethanolamine classes are ≈ 1.5 times decreased in RUVB +++ and RUVB +/- with respect to their controls.

Conclusion: A significant difference in the lipidomic profile of pterygium patients with RUVB +++ compared to RUVB +/- was found by using HPLC and LC-MS / MS.

19

Exposición al ambiente enriquecido protege las alteraciones de la retina y EPR inducidas por la AMD experimental en ratones

Hernán H. Diéguez^{1*}, Horacio E. Romeo², Agustina Alaimo³, Juan Salvador Calanni¹, Agustina Iaquinandí Murtagh¹, Mónica Chianelli¹, María Inés Keller Sarmiento¹, Pablo Horacio Sande Casal¹, Ruth Estela Rosenstein¹, Damián Dorfman¹.

¹Laboratorio de Neuroquímica Retiniana y Oftalmología Experimental, Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina (CEfyBO-UBA-CONICET), Buenos Aires, Argentina.

²Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias, Universidad Católica Argentina, BIOMED/CONICET, Buenos Aires, Argentina.

³Laboratorio de Dinámica Celular y Nanoherramientas, IQUI-BICEN/CONICET/UBA.

*her.die.14@gmail.com

La degeneración macular asociada a la edad seca (DMAE), principal causa mundial de ceguera en personas mayores, se caracteriza por la degeneración progresiva de los fotorreceptores (FR) y del epitelio pigmentario de la retina (EPR) circunscripto a la mácula. No existen terapias para prevenir o retrasar el inicio y progresión de la enfermedad. Desarrollamos un modelo experimental de DMAE en ratones mediante ganglionectomía cervical superior unilateral (GCSx) que reproduce las características centrales de la enfermedad. El ambiente enriquecido (AE) es un paradigma con efectos neuroprotectores probados en la retina adulta en diversas enfermedades degenerativas de la retina en roedores. Analizamos el efecto del AE sobre las alteraciones de FR/EPR inducidas por DMAE experimental. Ratones C57BL/6j macho adultos se sometieron a GCSx unilateral y se alojaron en ambiente estándar (AS) o AE por 10 semanas. Se analizaron la función (electroretinografía y pruebas visuales) y la histología

retinal 10 semanas pos-GCSx. El AE preservó la función visual, el contenido de melanina y la inmunorreactividad para RPE65 del EPR y la ultraestructura del EPR/FR. A las 6 semanas pos-GCSx, el AE previno el estrés oxidativo y la disminución de la masa mitocondrial e indujo un aumento de BDNF (reactividad y niveles) en la retina externa y el EPR. La exposición a AE iniciada a las 4 semanas pos-GCSx revirtió la disfunción visual y las alteraciones histológicas inducidas por GCSx. En conclusión, el AE previno y revirtió las alteraciones inducidas por DMAE experimental, posiblemente a través mecanismos dependientes del estrés oxidativo, mitocondriales y BDNF.

Exposure to enriched environment protects the retina and RPE alterations induced by experimental AMD in mice

Dry age-related macular degeneration (dAMD), the world's blindness leading cause in the elderly, is characterized by the progressive degeneration of photoreceptors (PR) and retinal pigment epithelium (RPE) circumscribed to the macula. Currently, there are not available therapies to prevent or delay the disease onset and progression. We have developed an experimental model of AMD through unilateral superior cervical ganglionectomy (SCGx) in mice, which reproduces the disease central hallmarks. Environmental enrichment (EE) is a paradigm has proven neuroprotective effects in the adult retina within experimental neurodegenerative diseases in rodents. Our aim was to analyze the effect of EE on the outer retina/RPE alterations induced by experimental dAMD. Adult male C57BL/6j mice were submitted to unilateral SCGx, whereas the contralateral side was submitted to a sham procedure and housed either in standard environment (SE) or EE for 10 weeks. Visual function (electroretinography [ERG] and visual behavior tests) as well as retinal histology were analyzed at 10 weeks post-SCGx. EE prevented the visual dysfunction, the reduction of both RPE melanin content and RPE65-immunoreactivity, and the RPE/PR ultrastructural alterations induced by SCGx in SE housed

animals. At 6 weeks post-SCGx, EE prevented oxidative stress, preserved mitochondrial mass and increased BDNF-immunoreactivity at the outer retina and RPE and BDNF protein levels. When EE exposure started at 4 weeks post SGCx, it reversed the functional and histological alterations induced by dAMD. In conclusion, the exposure to EE prevented and reversed the alterations induced by experimental dAMD, possibly through oxidative stress modulation, mitochondria protection and a BDNF dependent mechanism.

20

¿Existe verdaderamente un autoantígeno ocular en el ojo seco?

Alexia Vereertbrugghen*, Maximiliano Miglio, Solana Snitman, Carolina Maiumi Shiromizu, Irene Keitelman, Florencia Sabbione, Jeremías Galletti.

Laboratorio de Inmunidad Innata, Instituto de Medicina Experimental (CONICET-Academia Nacional de Medicina), Buenos Aires, Argentina.

*ale.vereert@gmail.com

Objetivos: Se acepta que el ojo seco (OS) es mediado por células T CD4+ específicas para un antígeno ocular desconocido. Aquí pusimos a prueba esta hipótesis mediante la restricción del repertorio T en un modelo murino.

Métodos: Modelo de OS quirúrgico en ratones Balb/c (repertorio T normal) y en ratones DO11.10 (repertorio T restringido, transgénicos para un receptor T específico para un antígeno no corneal) evaluando epitelopatía corneal (EC, por tinción con fluoresceína), sensibilidad mecánica corneal (SM, indica función nerviosa), apertura palpebral (ECR, indica dolor ocular) y la morfología de terminales nerviosas corneales intraepiteliales (TNIE).

Resultados: Los ratones DO11.10 pudieron desarrollar OS, evidenciado por aumento de EC y disminución de SM y ECR respecto del control (n=16, $p<0,05$) y disminución en la densidad nerviosa corneal (n=10, $p<0,05$), aunque de menor severidad que los Balb/c, que mostraron SM y ECR similares pero peor EC (n=16, $p<0,05$) y menor densidad de TNIE (n=12, $p<0,05$). La inmunización previa de los ratones

DO11.10 con su antígeno reconocido no afectó el grado de OS (n=16, $p<0,05$).

Conclusión: Que un repertorio T restringido se asocie a una enfermedad más leve sugiere que la especificidad antigénica es relevante, mientras que los ratones transgénicos inmunizados con su antígeno correspondiente no desarrollen una enfermedad más severa sugiere que la activación circunstancial de las células T CD4+ no está implicada. Ambos hallazgos apoyan la existencia de un autoantígeno corneal no identificado.

Is there really an ocular autoantigen in dry eye disease?

Objective: It is accepted that dry eye disease (DED) is driven by CD4+ T cells specific for an unknown ocular antigen. Here we tested this hypothesis by restricting the T cell repertoire in a murine model. Methods: surgical DED model in Balb/c mice (normal T repertoire) and DO11.10 mice (restricted T repertoire, transgenic for a T-cell receptor specific for a non-corneal antigen) evaluating corneal epitheliopathy (CE, by fluorescein staining), corneal mechanical sensitivity (SM, indicates nerve function), eye-closing ratio (ECR, indicates ocular pain) and the morphology of corneal intraepithelial nerves.

Results: DO11.10 mice still developed DED, evidenced by increased CE and decreased SM and ECR compared with control mice (n = 16, $p <0.05$), and decreased corneal nerve density (n = 10, $p <0.05$). However, their disease was milder than that in Balb/c mice, which showed similar SM and ECR but worse CD (n = 16, $p <0.05$) and lower corneal nerve density (n = 12, $p <0.05$). Prior immunization of DO11.10 mice with their cognate antigen did not affect DED severity (n = 16, $p <0.05$).

Conclusion: The fact that a restricted T cell repertoire is associated with milder disease suggests that antigenic specificity is relevant in DED, whereas the fact that transgenic mice immunized with their cognate antigen do not develop worse disease suggests that bystander activation of CD4+ T cells is not involved. Both findings support the existence of an as of yet unidentified corneal autoantigen.

α 2-macroglobulina aumenta en una retinopatía inducida por síndrome metabólico en ratón

María Constanza Paz^{1,5*}, María Victoria Vaglianti^{2,3}, Paula Virginia Subirada^{3,4}, Pablo Federico Barcelona^{2,3}, María Cecilia Sánchez^{2,3}

¹ Unidad de Investigación y Desarrollo en Tecnología Farmacéutica (UNITEFA-CONICET), Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

² Centro de Investigación en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI-CONICET).

³ Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

⁴ Instituto de Investigación Médica Mercedes y Martín Ferreyra (INIMEC-CONICET), Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

⁵ Departamento de Farmacología, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

*mcpaz@unc.edu.ar

El síndrome metabólico (MetSyn) es un complejo desorden del metabolismo que afecta diferentes órganos —incluyendo retina— que genera retinopatías. Estas patologías presentan progresiva degeneración neuronal además de alteraciones vasculares. En este sentido, α 2-macroglobulina (α 2-M) ha sido propuesta como un mediador de neurotoxicidad. Considerando que la neurodegeneración precede a lesiones microvasculares en retinopatías, se propuso evaluar la expresión génica y proteica de α 2-M en un modelo de MetSyn que presenta signos de retinopatía no proliferativa, tal como daño neuronal y alteraciones microvasculares leves. Se usaron ratones C57BL/6 (WT) y deficientes en apolipoproteína E (ApoE KO) alimentados con dieta normal (ND) o dieta fructosa (FD) al 10% peso/volumen en el agua de bebida, a partir de los 2 meses de edad. Luego de 4 meses de dieta, se obtuvieron extractos de retina para análisis por Western blot y RT-PCR cuantitativa. Los datos fueron analizados por ANOVA dos vías y post-test de Bonferroni ($p \leq 0,05$). Los procedimientos siguieron los estándares de la *Association for Research in Vision and Ophthalmology* (ARVO) y del comité de ética de la Facultad de Ciencias Químicas. Los resultados mostraron expresión del ARNm en retina de ratones y aumento significativo en la expresión proteica de α 2-M en extractos retinales de ratones ApoE KO alimen-

tados con ambas dietas, por lo tanto, α 2-M es sintetizada en retina y su expresión aumenta en ratones con alteraciones metabólicas. Estos resultados son un fuerte sustento para iniciar estudios que permitan conocer el rol de α 2-M en estadios tempranos de retinopatía inducida por MetSyn.

α 2-macroglobulin increase in a retinopathy induced by metabolic syndrome in mouse

Metabolic Syndrome (MetSyn) is a complex disorder of metabolism that affects different organs including the retina, triggering retinopathies. These diseases present, in addition to vascular alterations, a progressive neuronal degeneration. In this sense, α 2-macroglobulin (α 2-M) has been proposed as a mediator of neurotoxicity. Considering that the neurodegeneration precedes microvascular lesions in retinopathies, in this work, it was proposed to evaluate gene and protein expression of α 2-M in a mouse model of MetSyn that exhibits signs of non-proliferative retinopathy, such as neuronal impairment and mild vascular alterations. C57BL/6 (WT) and apolipoprotein E knockout (ApoE KO) mice fed with normal diet (ND) or 10% w/v fructose diet (FD) in drinking water from 2 months of age were used. After 4 months of diet retinal extracts were obtained for Western blot and qRT-PCR analysis. Data was statistically analyzed by two-way ANOVA and Bonferroni post hoc ($p \leq 0.05$). All experimental procedures will be carried out following the standards of The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) and the ethics committee of Chemical Sciences Faculty. The results showed α 2-M mRNA expression in mice retina and a significant increase of α 2-M protein expression in retinal extracts of ApoE KO mice with both diets, thus α 2-M is synthesized in the mouse retina and their expression is increased in mice with metabolic alterations. These results are more than encouraging and strongly support the initiation of studies that allow us to know the role of α 2-M in early stages of retinopathy induced by MetSyn.

La vía de la fosfolipasa D en procesos fagocíticos del epitelio pigmentario de la retina

Paula Estefanía Tenconi^{1*}, Vicente Bermúdez¹, Aram Asatryan², Pranab K. Mukherjee², Norma M. Giusto¹, Nicolás G. Bazan², Melina V. Mateos¹

¹Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca (INI-BIBB-CONICET), Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia (DBByF), Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina.

²Louisiana State University Health New Orleans, School of Medicine, Neuroscience Center of Excellence, New Orleans, Estados Unidos.

*petenconi@inibibb-conicet.gob.ar

Objetivo: Previamente demostramos que las fosfolipasas D (PLD1 y PLD2) median la respuesta inflamatoria y la autofagia en las células del epitelio pigmentario (RPE) expuestas a lipopolisacárido (LPS) y a altas concentraciones de glucosa (HG). El objetivo del presente trabajo es estudiar el rol de las PLD en los procesos fagocíticos del RPE.

Materiales y métodos: Se utilizó LPS (25 µg/ml) y HG (33 mM) para inducir la respuesta inflamatoria en las células ARPE-19 y ABC (una nueva línea celular de RPE humana). Para evaluar la fagocitosis se utilizaron pHrodo™ Red *E. coli* BioParticles® y segmentos externos de fotorreceptores bovinos (POS).

Resultados: Las células ABC expresan PLD1 y PLD2. Dado que el ácido fosfatídico generado por las PLD activa el complejo mTORC1 (*mammalian target of rapamycin*), principal inhibidor de la autofagia, estudiamos el efecto del silenciamiento de las PLD en la vía mTOR/S6K. En las células ABC el silenciamiento de PLD1 y PLD2 redujo la activación de S6K, en concordancia con el aumento de la autofagia previamente observado con los inhibidores de las PLD. En células ARPE-19, la exposición a HG y a LPS redujo la fagocitosis de las biopartículas mientras que los inhibidores de PLD1 y PLD2 no afectaron este proceso en condiciones basales. De manera similar, el silenciamiento de ambas PLD no afectó la fagocitosis basal de POS en las células ABC.

Conclusiones: Nuestros resultados demuestran la expresión de las PLD clásicas en una nueva

línea celular de RPE y su rol en la modulación de la vía mTOR/S6K. Resta aún dilucidar el rol de las PLD en los procesos fagocíticos del RPE bajo condiciones de inflamación.

The phospholipase D pathway in phagocytic processes of the retinal pigment epithelium

Objective: We previously demonstrated that classical phospholipases D (PLD1 and PLD2) mediate the inflammatory response and the autophagic process of retinal pigment epithelium (RPE) cells exposed to lipopolysaccharide (LPS) and high glucose (HG) concentrations. The aim of the present work was to further study the role of PLDs in phagocytic processes of RPE cells.

Material and methods: LPS (25 µg/ml) and HG (33 mM) were used to induce the inflammatory response of ARPE-19 and ABC (a novel human RPE cell line) cells. pHrodo™ Red *E. coli* BioParticles® and bovine photoreceptor outer segments (POS) were used to evaluate phagocytosis.

Results: ABC cells express PLD1 and PLD2. Since PLD-generated phosphatidic acid activates mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex), the main inhibitor of autophagy, we studied the effect of PLD1 and PLD2 silencing on mTOR/S6 kinase (S6K) activation. In ABC cells PLD1 and PLD2 silencing reduced S6K activation, in accordance with the increased autophagy previously observed with PLD inhibitors. In ARPE-19 cells, HG and LPS exposure significantly reduced pHrodo bioparticles phagocytosis while PLD1 and PLD2 inhibitors did not affect this process under basal conditions. In line with this, PLD1 and PLD2 silencing did not affect basal POS phagocytosis by ABC cells.

Conclusions: Our results demonstrate the expression of classical PLDs in a new RPE cell line and their role in the modulation of the mTOR/S6K pathway. Further experiments are needed to fully elucidate the role of PLD1 and 2 in the phagocytic process of RPE cells exposed to inflammatory conditions.

Arilalquilamina N-acetiltransferasa: "importación nuclear y función protectora contra la luz azul en la retina de aves"

Maximiliano N. Ríos*, Natalia A. Marchese, Mario E. Guido. CIQUIBIC-CONICET, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

*mrios@fcq.unc.edu.ar

La arilalquilamina N-acetiltransferasa (AANAT) es la enzima reguladora en la síntesis de melatonina. Se encuentra presente en la glándula pineal, la retina y otras regiones donde es controlada por la luz y el reloj molecular. El aumento de AMPc promueve su fosforilación (pAANAT) aumentando su actividad. La retina de los vertebrados es un tejido fotosensible, la exposición prolongada a la luz azul (BL) puede causar daño en la retina y alteración del reloj circadiano.

Objetivos: Investigar la regulación y el rol de AANAT en la retina embrionaria de pollo expuestas a luz azul.

Materiales y métodos: Se utilizaron cultivos primarios de retina embrionaria de pollo de 10 días. Fueron estudiados en oscuridad (D), expuestos por 1 hora de BL (68 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$) y 1 hora D post BL. De las células se purificaron proteínas, ARN y núcleos. Empleamos técnicas de inmunofluorescencia e inmunoblot. También se diseñaron shRNA específicos contra AANAT para disminuir su expresión y observar la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT.

Resultados: La expresión de AANAT se induce después de 1 hora post BL en comparación con los controles en D y muestra cambios en su localización desde el citoplasma al núcleo, aumentando en BL y permanecen elevados 1 hora post BL. Además, se detectaron niveles altos de pAANAT en fracciones nucleares de cultivos después del tratamiento con luz en comparación con el control D. Al disminuir la expresión de AANAT, la viabilidad celular evaluada 24 horas después, se vio significativamente afectada por una exposición de 1 hora BL en comparación con el control; no se observaron efectos en las condiciones de oscuridad.

Conclusión: Los resultados sugieren que AANAT es una enzima inducida por BL en las neuronas de la retina, promoviendo su fosforilación y localización nuclear, probablemente desempeñando una función protectora en respuesta a la exposición a BL.

Arilalkylamine N-acetyltransferase: "nuclear importation and protective role against the blue light in the bird retina"

Arilalkylamine N-acetyltransferase (AANAT) is the regulatory enzyme in the synthesis of melatonin, it is present in the pineal gland, the retina and other regions where it is controlled by light and the molecular clock. The increase in cAMP promotes its phosphorylation (pAANAT) by increasing its activity. The retina of vertebrates is a photosensitive tissue, prolonged exposure to blue light (BL) can cause damage to the retina and alteration of the circadian clock.

Objectives: To investigate the regulation and role of AANAT in BL-exposed chicken embryonic retina.

Materials and methods: Primary cultures of 10-day-old chick embryonic retina were used. They were studied in the dark (D), exposed by 1 hour of BL (68 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$) and 1 hour D post BL. Proteins, RNA and nuclei were purified from the cells. We use immunofluorescence and immunoblot techniques. Also, specific shRNAs were designed against AANAT to decrease its expression and observe cell viability the MTT assay.

Results: The expression of AANAT is induced after 1 hour post BL compared to controls in D and shows changes in its location from the cytoplasm to the nucleus, increasing in BL and remains elevated 1 hour post BL. In addition, high levels of pAANAT were detected in nuclear fractions of cultures after light treatment compared to control D. By decreasing the expression of AANAT, the cell viability evaluated 24 hours later, was significantly affected by 1 hour BL exposure compared to the control, non-effects were observed under dark conditions.

Conclusion: The results suggest that AANAT is an enzyme induced by BL in retinal neurons,

promoting its phosphorylation and nuclear localization, probably playing a protective role in response to BL exposure.

24

Sensor de lágrimas: evolución de técnicas y limitaciones

Martín Zalazar^{1,2*}, Gabriel Muñoz¹, Matías Machtey¹ y Rodrigo M. Torres³

¹Laboratorio de Prototipado Electrónico & 3D, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Entre Ríos, Oro Verde, Entre Ríos, Argentina.

²Instituto de Investigación y Desarrollo en Bioingeniería y Bioinformática (IBB-UNER-CONICET), Oro Verde, Entre Ríos, Argentina.

³ROMAT Creator Center, Colonia Avellaneda, Entre Ríos, Argentina.

*martin.zalazar@uner.edu.ar

Objetivo: Realizar un ensayo de confiabilidad de un sensor de lágrimas para su posterior aplicación en seres humanos.

Métodos: Usando una microbalanza de cristal de cuarzo (QCM) se midió la frecuencia de resonancia (f_0) y la disipación (D) del cristal a partir de su curva de conductancia, evaluando agua destilada y lágrimas artificiales (LA). Se realizaron estudios de: variabilidad para diferentes volúmenes, estabilidad temporal, comparación con dos equipos de medición (Placa AD y WVNA) y diferentes cristales (QCM y CQM-HFF), modificando el proceso de limpieza y calibración; también se controló la temperatura del entorno.

Resultados: Aumentando el volumen de la muestra, las LA presentan una disminución de la f_0 y aumento de D ; también se detecta variabilidad en las mediciones. Con el uso de cristales QCM y el equipo de medición Placa AD, se obtiene una menor dispersión en los valores de f_0 y D ; modificando el proceso de limpieza, no se halla una mejora en estos valores. Usando un tiempo de estabilización de 30 minutos, se observa una menor dispersión de f_0 y D . Con un sistema de control de temperatura por convección, los valores de f_0 y D aumentan su dispersión.

Conclusiones: Los resultados obtenidos usando LA no son concluyentes, por lo cual, para continuar con los ensayos en voluntarios sanos y patologías de superficie ocular se deberán realizar mejoras

al dispositivo, evaluando si la variabilidad encontrada afecta el rango de discriminación de lágrimas en condiciones de normalidad y enfermedad.

Tear sensor: evolution of techniques and limitations

Objective: To develop a reliability test of a tear sensor for its application in humans.

Methods: Using a quartz crystal microbalance (QCM), the resonance frequency (f_0) and dissipation (D) of the crystals were measured from their conductance curve, by evaluating distilled water and artificial tears (AT). Following experiments were carried out: variability for different volumes, stability in time, comparison using two measuring equipment (AD board and WVNA), and using two different crystals (QCM and QCM-HFF), also modifying cleaning and calibration process; temperature of the environment was also controlled.

Results: Increasing the sample volume, AT presents a decrease in f_0 and an increase in D ; variability is also detected in the measurements. With the use of QCM crystals and AD board, a lower dispersion is observed for f_0 and D ; modifying the cleaning process, no improvement is found in these values. Using a stabilization time of 30 minutes, a lower dispersion for f_0 and D is observed. With a convection temperature control system, the values of f_0 and D increase their dispersion.

Conclusions: Obtained results using LA are not conclusive, so to continue with the tests in healthy volunteers and ocular surface pathologies, improvements will have to be made; improvements on the device have to be addressed, thus evaluating if the variability found affects the range of discrimination of tears under conditions of normality and disease.

25

Estudios sobre el señalamiento cooperativo entre p75NTR y los receptores Trk en la modulación de la angiogénesis coroidea

Paula Virginia Subirada^{1*}, Albana Tovo², María Victoria Vaglianti², José Luna Pinto³, María Cecilia Sánchez², Agustín Anastasia¹, Pablo Federico Barcelona²

¹Instituto Ferreyra, INIMEC-CONICET, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

² Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI-CONICET), Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

³ Centro Privado de Ojos Romagosa, Fundación VER, Córdoba, Argentina.

*psubirada@gmail.com

Objetivo: El receptor de neurotrofinas p75 (p75^{NTR}) es una proteína transmembrana que medía el crecimiento, la supervivencia y muerte neuronal. p75^{NTR} puede acoplarse a distintos co-receptores para inducir señalización intracelular. Nuevas evidencias sugieren que p75^{NTR} es una pieza clave en el desarrollo de vasculopatías. Resultados propios muestran que p75^{NTR} incrementa en la glía retinal y en el infiltrado del epitelio pigmentario de la retina (EPR)-coroides de ratones con neovascularización coroidea (NVC). La delección de p75^{NTR} redujo la NVC y previno la disfunción de fotorreceptores. Ha sido demostrado que p75^{NTR} puede promover la señalización de los receptores Trk en ciertos escenarios. Nuestro objetivo fue determinar si p75^{NTR} modula la activación de receptores Trk durante la formación de neovasos.

Materiales y métodos: El modelo de NVC inducido por láser. Para estimar la activación de Trk realizamos ensayos de Western blot para detectar los niveles de fosforilación de vías río abajo: MAPK/ERK.

Resultados: Detectamos que la expresión de fosfo-ERK está disminuida en ratones NVC respecto de los controles, tanto en retina como en ERP-coroides 7 días postláser. No observamos inmunomarcación de pan-Trk ni fosfo-ERK en glía retinal (GS+ o GFAP+). Similarmente, no se observó co-localización entre pan-Trk y marcadores de infiltrado (f4/80+) del ERP-coroides. Sorprendentemente, los ratones deficientes de p75^{NTR} mostraron un incremento en la expresión proteica de fosfo-ERK a los 7 días post láser en retina y ERP-coroides.

Conclusión: Nuestros resultados sugieren que la formación de ovillos neovasculares en la NVC no es mediado por la señalización promovida por la asociación entre p75^{NTR} y los receptores Trk.

Studies about the cooperative signaling between p75^{NTR} and Trk receptors in the modulation of choroidal angiogenesis

Objective: The p75 neurotrophin receptor (p75^{NTR}) is a transmembrane protein that mediates neuronal growth, survival and death. p75^{NTR} can couple to different co-receptors to transduce intracellular signals. New evidences point p75^{NTR} as a key player in the development of vasculopathies. Previously, our results showed that p75^{NTR} increases 7 days post laser in retinal glia and RPE (retinal pigment epithelium)-choroid infiltrate of mice with choroidal neovascularization (CNV). The deletion of the receptor p75^{NTR} reduced CNV and prevented photoreceptor dysfunction. It has been reported that p75^{NTR} can promote Trk signalling in some scenarios. Thus, we aim to determine if p75^{NTR} modulates Trk activation during the neovessel formation.

Materials and Methods: Mouse model of laser-induced CNV. Trk activation was evaluated through its downstream pathways: MAPK/ERK phosphorylation by western blot assays and Immunofluorescence.

Results: We detected decreased expression of phospho-ERK in CNV mice respect to control, both in retina and in RPE-choroid 7 days post laser. Immunostaining did not showed localization of pan-Trk nor phospho-ERK in retinal glia (GS+ or GFAP+). Similarly, no overlapping was observed between pan-Trk and RPE-Choroid infiltrate (f4/80+). Surprisingly, p75^{NTR} deficient mice showed increased expression of phospho-ERK 7 days after laser in retina and RPE-Choroid.

Conclusion: In sum, our results suggest that the formation of vascular tufts in CNV is not promoted by the signalling of associated p75^{NTR} and Trk receptors.

Tratamiento del ojo seco hiposecretor con membrana amniótica pulverizada estéril

Emiliano Facundo Ross^{*1,2}, Alejandro Berra², Pablo Chiaradía³

¹ Servicio de Oftalmología del Hospital Nacional Posadas, El Palomar, Argentina.

² Laboratorio Traslacional de Inmunopatología & Oftalmología, Departamento de Patología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

³ Hospital de Clínicas José de San Martín, Buenos Aires, Argentina.

*ross.e.facundo@gmail.com

Objetivo: Comparar la eficacia del tratamiento con membrana amniótica humana liofilizada micronizada estéril (hAM-pe) versus suero autólogo (SA) en el tratamiento de ojo seco hiposecretor.

Métodos: Ensayo clínico con grupo control histórico. Variable de resultado principal: diferencia en los escores de tinción conjuntival con lisamina verde (TCLV). Variables de resultado secundarias: escore de tinción corneal con fluoresceína (TCF), test de Schirmer I, tiempo de ruptura lagrimal (TBUT) y puntuación en el cuestionario OSDI (*Ocular Surface Disease Index*). Las evaluaciones fueron al inicio, a los 30 y a los 60 días.

Resultados: En el grupo hAM-pe se encontraron diferencias significativas en las comparaciones 0-30 días y 0-60 días; y en la comparación basal-60 días para el grupo SA. No hubo diferencias entre tratamientos. Variables de resultado secundarias: para la TCF las diferencias fueron significativas en las comparaciones 0-30 y 0-60. En el grupo tratado con SA no se encontraron diferencias. Los puntajes OSDI obtenidos en el grupo hAM-pe disminuyeron conforme avanzaba el tratamiento, encontrándose diferencias entre cada instancia. En el grupo SA, el único par significativo fue el basal-60 días. Las variables BUT y test de Schirmer no mostraron diferencias.

Conclusiones: El tratamiento con hAM-pe demostró mejorías estadísticamente significativas en los escores de tinción conjuntival con lisamina verde, siendo además no inferior al SA. Estas diferencias se encontraron también en los escores TCF. Las pacientes reportaron mejoras en la sintomatología en ambos grupos de tratamiento, aquellas tratadas con hAM-pe parecen haber mejorado más rápidamente.

Amniotic membrane treatment for hyposecretory dry eye

Objective: To evaluate the clinical efficacy of treatment with amniotic membrane extract eye drops (AMEED) for hyposecretory dry eye.

Methods: Main outcomes measures: the primary end point was changes in the lisamina green conjunctival staining (LGCS) score to demonstrate ocular surface damage. Secondary end points were fluorescein corneal staining (FCS)

score, Schirmer's test results, tear film break up time (TBUT) and severity of symptoms reported by patients according to the ocular surface disease index (OSDI). Estimations were performed at baseline, 30 and 60 days.

Results: For primary end point, the mean in LGCS score in the AMMED group showed significant improvement regarding baseline-30 day and 30-60 day, whereas in the ASED group an improvement for this score was significant in the baseline 60-day comparison. Regarding secondary end points, a change in the FCS score mean between baseline and 60-day were significant in the AMMED group. Patients had a significant improvement of their symptoms in both groups when we compared baseline-60-day, but in AMEED we found changes between baseline and 30-day as well as between 30 and 60-day.

Conclusions: AMEED demonstrated statistically significant improvements in LGCS and FCS. Patients reported amelioration of their symptoms in both groups; however, those treated with AMMED showed apparently faster improvement.

Efecto del ácido nitro-oleico en la neovascularización y neurodegeneración en un modelo de retinopatía inducida por oxígeno

María Victoria Vaglianti^{1,2*}, Paula Virginia Subirada^{1,2§}, Belén Joray³, María Constanza Paz^{1,2#}, Pablo Federico Barcelona^{1,2}, Gustavo Bonacci^{1,2}, María Cecilia Sánchez^{1,2}

¹ Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

² Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI-CONICET), Córdoba, Argentina.

³ Instituto de Investigaciones en Recursos Naturales y Sustentabilidad José Sánchez Labrador S.J. (IRNASUS-CONICET), Córdoba, Argentina.

[§] Lugar actual de trabajo: Instituto de Investigación Médica Mercedes y Martín Ferreyra (INIMEC-CONICET), Córdoba, Argentina.

[#] Lugar actual de trabajo: Unidad de Investigación y Desarrollo en Tecnología Farmacéutica (UNITEFA-CONICET), Córdoba, Argentina.

*mvaglianti@unc.edu.ar

Objetivo: La inflamación y el estrés oxidativo participan en las retinopatías neovasculares. Los ácidos grasos nitrados son electrófilos moduladores de vías de señalización celular con propiedades antiinflamatorias y antioxidantes (Keap1/

Nrf2). El objetivo de nuestro trabajo es evaluar el efecto del ácido nitro-oleico en un modelo de retinopatía inducida por oxígeno (OIR).

Materiales y métodos: Ratones OIR fueron inyectados vía intraocular en P12 con 5 μ M de NO₂-OA o vehículo, e intraperitoneal a los días P14, P17, P20, P23 con 15 mg/Kg de NO₂-OA o vehículo. Los ratones fueron sacrificados a P17 o P26. Ratones de la misma edad en aire fueron usados como control. Algunos ojos fueron fijados para obtener retina completa para microscopía y otros para ensayos de WB o RT-PCR. La funcionalidad retinal fue evaluada por electroretinografía escotópica (ERG). Las amplitudes y latencias de las ondas a y b se analizaron a P17 y P26. Finalmente, el efecto de NO₂-OA sobre neovascularización fue evaluado por el ensayo de tubulogénesis. Para el análisis estadístico fue utilizado el programa GraphPad Prism.

Resultados: NO₂-OA indujo el crecimiento vascular, disminuyó la neovascularización y produjo cambios significativos en GS y GFAP al día P17OIR. Al día P26 NO₂-OA previno la disminución de la amplitud de la onda b, y evitó la disminución de la Caspasa-3 total. Finalmente, se observó una significativa disminución en la longitud total de los segmentos y el número de estructuras tubulares después del NO₂-OA.

Conclusión: Estos hallazgos sugieren que NO₂-OA es un agente beneficioso para las células retinales con un efecto citoprotector.

Effect of nitro-oleic acids in neovascularization and neurodegeneration in oxygen-induced retinopathy model

Purpose: Inflammation and oxidative stress are involved in neovascular retinopathies (NR). Nitro fatty acids are important electrophilic signaling mediators with anti-inflammatory and antioxidant properties (Keap1/Nrf2 pathway). Here, our aim is to evaluate the effect of nitro-oleic acid (NO₂-OA) in oxygen-induced retinopathy mouse model (OIR).

Materials and methods: OIR mice were intraocular (i.o.) injected at P12 with 5 μ M of NO₂-OA or vehicle and intraperitoneal (i.p) at P14, P17, P20, P23 with 15 mg/Kg of NO₂-OA

or vehicle. At P17 or P26 mice were sacrificed. Age-match mice in RA were used as controls. Some eyes were fixed to obtain whole mount for microscopy and other retinas were used for Western blot or RT-PCR assays. The electrical activity of the retina in response to a light stimulus was measured by scotopic electroretinography (ERG). Amplitudes and latencies of a- and b-waves from scotopic ERG were recorded at P17 y P26. Finally, the NO₂-OA effect on neovascularization was evaluated by tube formation assay. GraphPad prism was used for statistical analysis.

Results: NO₂-OA induced vascular regrowth, reduced neovascularization and produced significant changes in GS and GFAP at P17 OIR. At P26 NO₂-OA prevented the decrease in b-wave amplitude as well as the diminished expression of total Caspase-3 protein. Finally, a significant decrease in the total segment length and number of tubular structures was observed after NO₂-OA treatment.

Conclusions: These findings suggest that NO₂-OA could be beneficial or cytoprotective for retinal cells in OIR model.

El fragmento neurotrófico 17-mer del factor derivado del epitelio pigmentario (PEDF) promueve la supervivencia de los fotorreceptores de ratones rd1 portadores de una degeneración retinal

Solange Viera^{1*}, Harmonie Vallese¹, Germán Michelis^{1,2}, Nora Rotstein¹, Olga Lorena German¹, Patricia Becerra², Luis Politi²

¹ Instituto de Investigaciones Bioquímicas (INIBIBB-CONICET), Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina; ² National Eye Institute, National Institutes of Health (NEI-NIH), Bethesda, Estados Unidos.

Subsidios: FONCYT, CONICET y UNS.

*solangefac@gmail.com

Objetivos: Las neuronas fotorreceptoras (FR) de la retina degeneran irreversiblemente causando disfunción visual en la retinitis pigmentaria. Dado que los FR requieren varios factores neurotróficos para su supervivencia, su utilización ha sido intensamente estudiada para desarrollar un tratamiento que permita prevenir la

degeneración. Recientemente establecimos que el PEDF y los fragmentos 17-mer (p17) y 34-mer, derivados del dominio neurotrófico, promueven la supervivencia de FR de retinas de rata. Investigamos ahora si el p17 previene la muerte de los FR en un modelo animal de retinitis pigmentaria, el ratón *rd1*.

Métodos: Cultivos mixtos neurogliales y neuronales puros, obtenidos de retinas *rd1*, fueron incubados o no con p17 (10 nM) durante 7 y 5 días, respectivamente. Se evaluó luego el efecto de p17 sobre la fragmentación nuclear, utilizando DAPI, el número de FR, por inmunofluorescencia con CRX, un marcador específico y el desarrollo de lamelipodios gliales con faloidina.

Resultados: Los resultados preliminares mostraron que p17 redujo la muerte de los FR *rd1*. En cultivos neurogliales y neuronales puros controles, un 38% y 48% de los FR, respectivamente, mostraron núcleos fragmentados, mientras que p17 redujo un 31,5% y 36% la fragmentación nuclear. Notablemente, también promovió el desarrollo de los lamelipodios de las células gliales de Müller (CGM), afectado en cultivos controles.

Conclusión: Estos resultados sugieren que el péptido 17-mer activaría mecanismos de supervivencia en los FR, restauraría la organización del citoesqueleto en las CGM y respalda un potencial valor terapéutico del fragmento 17-mer para el tratamiento de enfermedades retinod degenerativas.

The neurotrophic 17-mer fragment from the pigment epithelial derived factor (PEDF) promotes survival of photoreceptor from *rd1* mice carrying a retinal degeneration

Purpose: Retina photoreceptors (PHRs) irreversibly degenerate in retinitis pigmentosa, lead-

ing to visual dysfunction. Since PHRs depend on several neurotrophic factors for their survival, their provision has been extensively explored for therapeutical purposes. We have recently established that PEDF and its fragments, 17-mer (p17) and 34-mer, derived from its neurotrophic domain, promote the survival of rat retina PHRs. We here explore whether p17 prevents PHR death in an animal model of retina degeneration, the *rd1* mouse.

Methods: Mixed neuroglial and pure neuronal cultures, prepared from *rd1* retina, were incubated, or not, with p17 (10nM) for 7 or 5 days, respectively. The effect of p17 was then evaluated on nuclear fragmentation, using DAPI; the amount of PHRs, labeled with their specific marker CRX, and the extension of glial cell lamelipodia, with phalloidin.

Results: Preliminary results showed that p17 reduced *rd1* PHR death. In control neuroglial and pure neuronal cultures, about 38% and 48% of PHRs evidenced fragmented nuclei, whereas p17 reduced nuclear fragmentation by 31.5% and 36%, respectively. Noteworthy, p17 also promoted the development of lamelipodia in Müller glial cells (MGC), which was affected in control cultures.

Conclusion: These results suggest that the p17 peptide activates mechanisms leading to the survival of PHRs and restores cytoskeletal organization in MGC, and support the therapeutical potential of p17 for treating neurodegenerative retinopathies.

Índice de autores/Authors' index

Los números luego de cada nombre indican la numeración correspondiente a los resúmenes.
Numbers after names indicate the numbering corresponding to the abstracts.

- Adur, Javier, 11
Agüero, Carlos, 12
Alaimo, Agustina, 19
Anastasia, Agustín, 25
Asatryan, Aram, 22
Barcelona, Pablo Federico, 1, 7, 21, 25, 27
Bareiro, Mariana, 14
Barrionuevo, Pablo, 12
Bazán, Nicolás G., 22
Becerra, Patricia, 28
Beltramone, Natalia, 17
Bermúdez, Vicente, 10, 22
Berra, Alejandro, 6, 26
Berrios, Waleska, 8
Bhattacharya, Sanjoy, 18
Bonacci, Gustavo, 27
Cagnasso, Juan Ignacio, 8
Calanni, Juan Salvador, 9, 19
Cámpora, Nuria, 8
Capurro, Claudia, 17
Castro, Analía, 15
Challiol, Camila Fernanda, 8
Chamorro Aguirre, Estefanía, 2
Chiabrando, Gustavo Alberto, 7
Chianelli, Mónica, 9, 19
Chiaradía, Pablo, 26
Diéguez, Hernán H., 9, 19
Domínguez, Lucía, 11
Dorfman, Damián, 9, 19
Echevarría, María Sol, 10
Etchart, Juan, 11
Fernández, María Cecilia, 8
Formica, María L., 1
Galletti, Jeremías, 4, 13, 20
García Venzor, Alfredo, 17
Gaveglia, Virginia, 2
Germán, Olga Lorena, 28
Giménez, Melina C., 5
Girardi, Elena, 14
Giusto, Norma M., 22
Golimstok, Angel, 8
González Fleitas, María Florencia, 9
Guarnieri, Fabio, 3
Guido, Mario E., 16, 23
Guzmán, Mauricio, 4
Iaquinandi Murtagh, Agustina, 5, 9, 19
Irós, Mariano, 18
Issolio, Luis, 12
Joray, Belén, 1, 27
Keitelman, Irene, 4, 13, 20
Keller Sarmiento, María Inés, 9, 19
Larrayoz, Ignacio M., 14
Lavaque, Alejandro, 12
Loidl, Cesar Fabián, 14
López, Ester María, 14
López, Juan, 18
López-Costa, Juan José, 14
Luna Pinto, José, 1, 7, 25
Machtey, Matías, 24
Mañez, Mariané B., 5
Marchese, Natalia A., 16, 23
Martínez, Alfredo, 14
Mateos, Melina V., 10, 22
Medina, Esteban, 18
Michelis, Germán, 28
Miglio, Maximiliano, 4, 13, 20
Miranda, Pablo, 15
Mombrú, Álvaro W., 15
Mukherjee, Pranab K., 22
Muñoz, Gabriel, 24
Ortiz Basso, Tomás, 8
Palma, Santiago, 1, 15
Pardo, Helena, 15
Pascual, Ana Clara, 2

Pasquaré, Susana, 2
Paz, María Constanza, 1, 21, 27
Pellegrino, M., 9
Pereira, Luciana, 15
Peretti, Luciano, 11
Piqueras, M. C., 18
Politi, Luis, 28
Rey-Funes, Manuel, 14
Ríos, Maximiliano N., 16, 23
Romeo, Horacio E., 19
Rosenstein, Ruth Estela, 9, 19
Ross, Emiliano Facundo, 26
Rotstein, Nora, 28
Sabbione, Florencia, 4, 13, 20
Sánchez, María Cecilia, 1, 7, 21, 25, 27
Sande Casal, Pablo Horacio, 5, 9, 19
Sanhueza Salas, Francisco, 17
Santiago, Gustavo, 3
Serra, Horacio Marcelo, 18
Shiromizu, Carolina Maiumi, 4, 13, 20
Silberman, Dafne Magalí, 17
Snitman, Solana, 4, 13, 20
Soliño, Manuel, 14
Suárez, María Fernanda, 18
Subirada, Paula Virginia, 1, 7, 21, 25, 27
Tártara, Ignacio, 15
Tenconi, Paula Estefanía, 10, 22
Toiber, Deborah, 17
Torbidoni, Ana, 6
Torres, Rodrigo M., 3, 11, 24
Tovo, Albana, 7, 25
Tripolone, Constanza, 12
Unger, Melisa, 5
Vaglianti, María Victoria, 1, 7, 21, 25, 27
Vallese, Harmonie, 28
Valverde, Gastón, 6
Vereertbrugghen, Alexia, 4, 13, 20
Viera, Solange, 28
Villanueva, Juan Pablo, 15
Vottero, Nicolás, 3
Zalazar, Martín, 24
Zimet, Patricia, 15