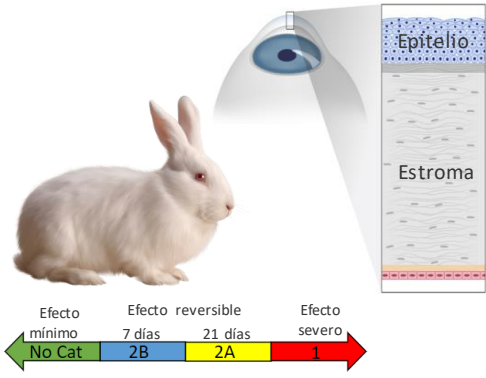


Martina Daniela Benedetti^{1,2}, Martín Rivero², Romina Martínez³, Mariela Lenze^{1,2}, Julieta Roco^{1,2}, Silvia Wikinski^{1,2} y María Laura Gutiérrez^{1,2}
martina_benedetti97@hotmail.com

¹CONICET. ²Instituto de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Argentina. ³Hospital Dr Julio Méndez

Introducción



Los métodos alternativos aprobados no permiten documentar la reversibilidad del daño (2A y 2B).

En el daño corneal producido por la exposición química, hay dos puntos clave que pueden identificarse y determinarán la reversión del daño: el daño a nivel del epitelio y la desorganización de los componentes del estroma subyacente. En este proyecto proponemos estudiar ambos eventos.

OBJETIVO: Estudiar la reversión del daño corneal producido por la exposición química *in vitro* y lograr un abordaje que permita predecirla para así reemplazar el uso de conejos en las pruebas de irritación ocular.

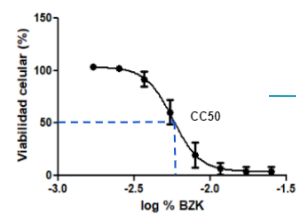


Tabla 1. Productos de referencia utilizados para la puesta a punto de las distintas metodologías.

Producto	CAS RN	Concentración de uso	Clasificación GHS <i>in vivo</i>
BZK	8001-54-5	5%	Cat 1
NaOH	1310-73-2	1%	Cat 2
Tritón X 100	9002-93-1	5%	Cat 2 A
Isopropanol	67-63-0	100%	Cat 2 A
SDS	151-21-3	Sólido	Cat 2 A
EtOH	64-17-5	100%	Cat 2 B
Tween 20	9005-64-5	100%	Sin cat

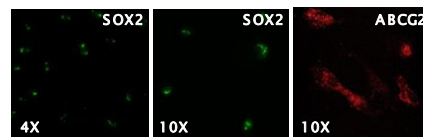
Metodología y resultados

Modelo de córnea bovina

Obtención de células madre limbales



Caracterización celular por inmunofluorescencia



Células aisladas marcadas con anticuerpo anti-SOX2 y anti-ABCG2, marcadores característicos de células madre.

Evaluación de citotoxicidad con rojo neutro

Producto	CC50 MSCs
BZK	0.0057%
Tritón X 100	0.015%
SDS	0.075%
Tween 20	6.9%
Etanol	19.0%

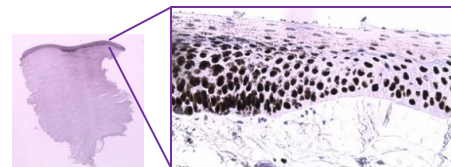
Cultivo de explanto limbal



Evaluación de las poblaciones celulares del halo de crecimiento

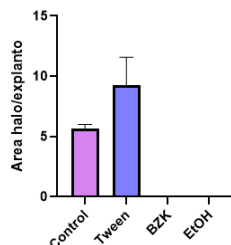


Tinción celular con cristal violeta 0,5% a los 13 días

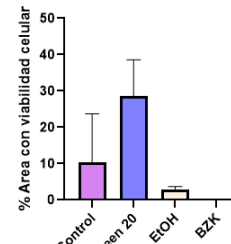


Inmunohistoquímica del limbo bovino utilizando el anticuerpo P40 anti-DNP63. Se observa tinción nuclear en células basales y en células intermedias. Este marcador permite identificar células madre del limbo.

Crecimiento del halo de explanto



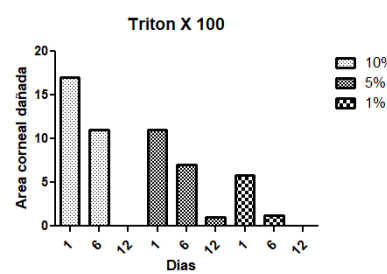
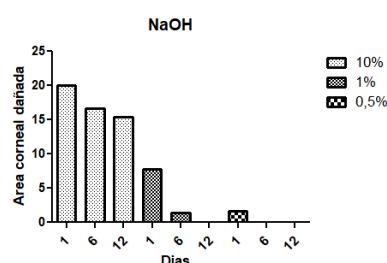
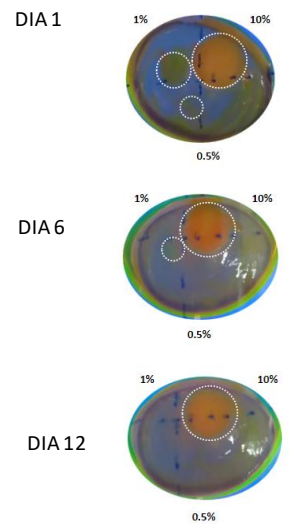
Viabilidad celular



Cultivo de córnea bovina

Tra tamiento por 10 min con productos de referencia
Tinción con fluoresceína para evidenciar el área dañada.

NaOH 10%, 1% y 0,5%



Se observó crecimiento del halo de explanto cuando se trató con Tween 20 (Sin cat). No se observó crecimiento del halo cuando los ojos bovinos fueron tratados con BZK (Cat 1), tampoco hubo viabilidad celular en este caso. Por otro lado, en el tratamiento con EtOH (Cat 2B) si bien no hubo crecimiento de halo, si se evidenció viabilidad celular.

Se trataron las córneas con distintas concentraciones de NaOH (Cat 1) y Tritón X 100 (Cat 2A). Se observó la reversión del daño en todas las concentraciones de Tritón X 100 y en las concentraciones de 1 y 0,5% de NaOH, no así en la de 10% donde no hubo reversión del daño.

Este novedoso proyecto constituye un gran aporte al desarrollo del conocimiento del campo de los métodos alternativos al uso de animales. Al concluir los objetivos propuestos, contaremos con evidencia que permita determinar cuál o cuáles de los abordajes empleados, o qué combinación de los mismos, permite detectar con especificidad la categoría de los productos de referencia de GHS y EPA.

Bibliografía

- 1.OECD. Test No. 405: Guidelines for the Testing of Chemicals. Acute Eye Irritation/Corrosion. *OECD Guidel. Test. Chem* 21 (2017).
- 2.Guidelines, O. Test Guideline No. 437 Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants Updated Test Guideline 437 on the BCOP Test Method for Eye Hazard Potential. (2020).
- 3.Meek, K. M. & Knupp, C. Progress in Retinal and Eye Research Corneal structure and transparency. *Prog. Retin. Eye Res.* 49, 1–16 (2015).
- 4.Pellegrini, G. *et al.* p63 identifies keratinocyte stem cells. (2001).
- 5.37.OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. *TG 491: Short time exposure In Vitro test method.* 1–14 (2015).
- 6.Jd, O. A. U. *et al.* Effects of explant size on epithelial outgrowth, thickness, stratification, ultrastructure and phenotype of cultured limbal epithelial cells. 1–22 (2019).
- 7.Piehl, M., Carathers, M., Soda, R., Cerven, D. & DeGeorge, G. Toxicology in Vitro Porcine Corneal Ocular Reversibility Assay (PorCORA) predicts ocular damage and recovery for global regulatory agency hazard categories. *Toxicol. Vit.* 25, 1912–1918 (2011).

Discusión y perspectivas a futuro

- ✓ Fue posible poner a punto exitosamente la extracción de células del limbo de córnea bovina, resta avanzar sobre su caracterización.
- ✓ Se puso a punto el ensayo de citotoxicidad con una serie de compuestos de referencia observándose que la metodología de rojo neutro es efectiva para cuantificar el daño celular.
- ✓ Se puso a punto el cultivo de explantos de limbo bovino y la evaluación del crecimiento del halo frente al tratamiento con distintos productos de referencia. En un futuro se avanzará sobre la evaluación de las poblaciones celulares que conforman el halo.
- ✓ Se logró el cultivo organotípico de córnea bovina y se observó reversión de daño en el tiempo.

Financiamiento

