

Microscopia óptica avanzada aplicada al estudio de la retina. Análisis de su posible utilización como herramienta de diagnóstico de patología ocular

L. Dominguez, F. Sabatter, J. Etchart, R. Torres y J. Adur

Autoras/es: Laboratorio de Microscopia Aplicada a Estudios Moleculares y Celulares (LMAE). Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Entre Ríos, Argentina. Ruta provincial 11, km 10 Oro Verde, Entre Ríos, Argentina.

Contacto: javier.adur@uner.edu.ar

DOI: <https://doi.org/10.33255/1621/2749>

Resumen

La retina está potencialmente afectada de forma directa, por el paso del tiempo, como de forma indirecta, por el modo en el que ese tiempo pasa y como ha estado protegida o expuesta a noxas. Recientemente, las técnicas basadas en la autofluorescencia retiniana, como la microscopía de barrido láser confocal (CLSM) y microscopía de imagen del tiempo de vida de la fluorescencia (FLIM) han encontrado amplias aplicaciones en oftalmología. Fundamentalmente porque son extremadamente sensibles y no invasivas.

La técnica de FLIM es una modalidad de imagen emergente para la medición de los tiempos de vida de los fluoróforos retinianos como aminoácidos aromáticos, cromóforos y algunos pigmentos. El presente proyecto, pretende observar la retina utilizando modernas técnicas de microscopía (CLSM y FLIM) con el objetivo de obtener nuevos indicadores de diagnóstico.

Palabras claves: autofluorescencia, microscopia de tiempo de vida de la fluorescencia, retina retinopatía diabética

Objetivos propuestos y cumplidos

Los objetivos propuestos para este proyecto fueron:

- Desarrollar metodologías multimodales utilizando la autofluorescencia de la retina de ratones para ser aplicadas al diagnóstico y seguimiento de patologías.
- Estandarizar un método para la evaluación de la retina, procesando y analizando imágenes de intensidad y de tiempos de vida de la autofluorescencia.
- Utilizar un modelo animal de retinopatía diabética en ratones para validar la técnica desarrollada y para determinar parámetros cuantitativos que permitan ser utilizados posteriormente como indicadores de diagnóstico y seguimiento.

Los objetivos planteados fueron cumplidos prácticamente en su totalidad, dado que pudimos implementar una metodología para observar la retina y analizar las principales estructuras fluorescentes de su epitelio. Se lograron establecer datos cuantitativos que permitieron identificar cambios tempranos de la fluorescencia. Diferentes métodos y protocolos de cuantificación del tiempo de vida de la fluorescencia fueron testeados.

INTRODUCCION

La retina es un tejido complejo, compuesto por células nerviosas, encargado de realizar la fototransducción de la energía lumínica externa. Posee gran actividad metabólica, tanto en condiciones fotópicas como escotópicas. Con un rol principal no solo para las funciones visuales del ojo, sino que también cumple un rol principal en el sistema neuro-endocrino, mediante la estimulación o inhibición de la secreción de melatonina y la regulación del ciclo circadiano [1]. Este tejido es susceptible a trastornos sistémicos, ya sea endocrinológicos, como la Diabetes Mellitus, desarrollando así Retinopatía Diabética [2,3]. Así, la retina está potencialmente afectada de forma directa, por el paso del tiempo, como de forma indirecta, por el modo en el que ese tiempo pasa y como ha estado protegida o expuesta a noxas.

Recientemente, las técnicas basadas en la autofluorescencia retiniana, como la microscopía de barrido láser confocal (CLSM) y microscopía de imagen del tiempo de vida de la fluorescencia (FLIM) han encontrado amplias aplicaciones en oftalmología [4,5]. Fundamentalmente porque son extremadamente sensibles y no invasivas. Las imágenes de autofluorescencia convencionales miden la intensidad de fluorescencia de los fluoróforos retinianos endógenos. Principalmente deriva su señal de lipofusina a nivel del epitelio pigmentario de la retina. Sin embargo, la autofluorescencia no solo puede caracterizarse por la distribución espacial de la intensidad de fluorescencia o el espectro de emisión, sino también por una función característica que es el tiempo de vida de la fluorescencia. La técnica de FLIM es una modalidad de imagen emergente para la medición de los tiempos de vida de los fluoróforos retinianos como aminoácidos aromáticos, cromóforos y algunos pigmentos [6].

Los tiempos de vida de la fluorescencia dependen del entorno molecular pero son en gran medida independientes de la concentración del fluoróforo [7]. Por lo tanto, la medición del tiempo de vida de la fluorescencia se puede aplicar para detectar fluoró-

foros débilmente fluorescentes si difieren en términos de su tiempo de vida. Además, los tiempos de vidas pueden usarse como indicador de condiciones metabólicas específicas de cambios dentro del microambiente molecular [7]. Por lo tanto, mapear el tiempo de vida de la fluorescencia de un fluoróforo en una célula o un tejido es esencialmente mapear los procesos bioquímicos que ocurren en la vecindad del fluoróforo durante la descomposición.

Más allá de la experiencia clínica del profesional, para mejorar la precisión en los diagnósticos, el avance de la tecnología y los nuevos métodos de imágenes, está jugando un rol crucial [8]. Sin embargo, al día de hoy aún existen problemas sin resolver, a la hora de evaluar la respuesta terapéutica y comprender el funcionamiento de la retina en vivo.

La trascendencia de investigar sobre el tema, es amplia. La expectativa de vida aumenta y por ende se espera que cada vez más aumente la cantidad de personas en el mundo que padezcan ceguera legal y discapacidad visual secundaria a patologías retinianas. La diabetes es la principal causa de ceguera evitable en el mundo, que silenciosamente puede ir afectando la salud y la calidad de vida de una persona. En esta patología, se genera una “microangiopatía” y el ojo, específicamente la retina, es uno de los tres clásicos sitios donde se producirán las principales alteraciones. Contar con metodologías y modelos, como los que se proponen en el presente proyecto, que permitan comprender y detectar a tiempo estos desequilibrios retinianos es fundamental para prevenir daños en la visión.

METODOLOGÍA

Observación del globo ocular murino

Se trabajó con ratones machos adultos de la cepa BALB/c Cmedc, provenientes del Centro de Medicina Comparada (UNL – CONICET – ICIVET LITORAL). Los procedimientos sobre los ratones siguieron los lineamientos establecidos en la guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio y las recomendaciones establecidas por ARVO para el uso de animales en estudios de experimentación [8]. Para la obtención de las muestras, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y se extrajeron ambos globos oculares. Los izquierdos fueron inmediatamente fijados en una solución de paraformaldehído (PFA) y los derechos colocados en solución salina de buffer fosfato (PBS).

Técnica de montaje plano: para visualizar solo el epitelio retinal (EPR) se realizó un protocolo modificado de [9]. Brevemente, después de la eutanasia los ojos izquierdos fueron enucleados utilizando unas pinzas de disección y luego fueron perforados en el limbo con una aguja de 20G. El ojo se sumergió en 1 ml de una solución de paraformaldehído (PFA) al 4% en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y recogida en un tubo Eppendorf. Luego se dejó reposar toda la noche en heladera. Doce horas después, se lavó el globo ocular con PBS y se cortó utilizando un microscopio estereoscópico binocular. Con una tijera de Vannas, se extrajo la córnea cortando en un recorrido circular a lo largo de la ora serrata, sujetando el ojo en el limbo con fórceps. Sosteniendo firmemente el globo ocular, se extrajeron el cristalino, el vítreo y la retina neural. Se colocó el globo ocular en un portaobjetos y se hicieron cuatro incisiones desde la periferia hasta el nervio óptico, lo que da como resultado una estructura similar a una flor de cuatro pétalos. Eso ayuda a hacer una preparación plana. El tejido se estiró con

papel de filtro y el EPR se colocó mirando hacia arriba y la esclerótica mirando hacia el portaobjetos. Finalmente, se observó la preparación del montaje plano con el microscopio laser confocal y se registró la autofluorescencia utilizando los detectores PMT internos del cabezal confocal.

Técnica transescleral: los exámenes del ojo derecho se realizaron 3 minutos después de la enucleación. La Figura 1 muestra el abordaje transescleral realizado. Brevemente, consiste en enfocar el objetivo 1 mm detrás del limbo. El globo ocular, alojado dentro de una placa de Petri, se manipula delicadamente utilizando unas pinzas finas para lograrla posición adecuada. Para obtener una alineación precisa, la inspección inicial se realiza bajo una lámpara ultravioleta (UV) convencional, lo que facilita la identificación rápida de las capas de la retina a través de los oculares del microscopio. Una vez localizada la posición, se selecciona uno de los láseres continuos y el sistema cambia a modalidad confocal para realizar el barrido y reconstruir la imagen final.

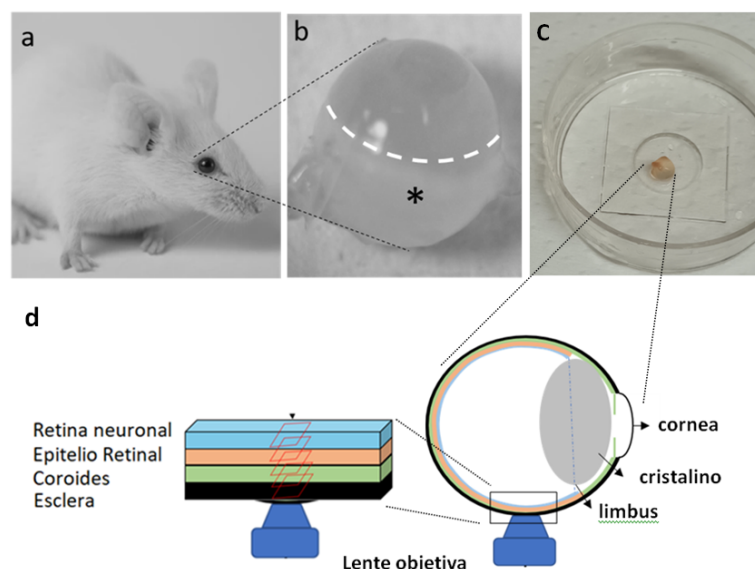


Figura 1: Configuración Transescleral (se ilumina la retina evitando la córnea y el cristalino). a) ratón, b) globo ocular (líneas de trazos blancos indican el limbo), * posición donde debe enfocar la lente objetiva, c) globo ocular montado para su observación, d) esquema de las diferentes capas del globo ocular y posición del objetivo en configuración transescleral.

Sistema de microscopía

El globo ocular fue observado utilizando la plataforma laser confocal LSM880 de Carls Zeiss disponible en el LAMAE (Figura 2). Básicamente la misma consta de un Microscopio óptico invertido de fluorescencia de barrido láser Confocal montado sobre un estativo AxionObserver Z1 con LSM 880 y módulo de super-resolución AiryScan de ZEISS. Se utilizó el objetivo de 63x (inmersión aceite) con las siguientes líneas de láseres continuos: 405 nm y 440 nm. Además, éstas mismas líneas de laser fueron seleccionadas para trabajar en modo pulsado lo que junto con los sistemas de conteo de fotones únicos de la empresa Becker & Hickl permite hacer la técnica de FLIM para medir el tiempo de vida de la fluorescencia. El sistema completo se observa en la siguiente figura.

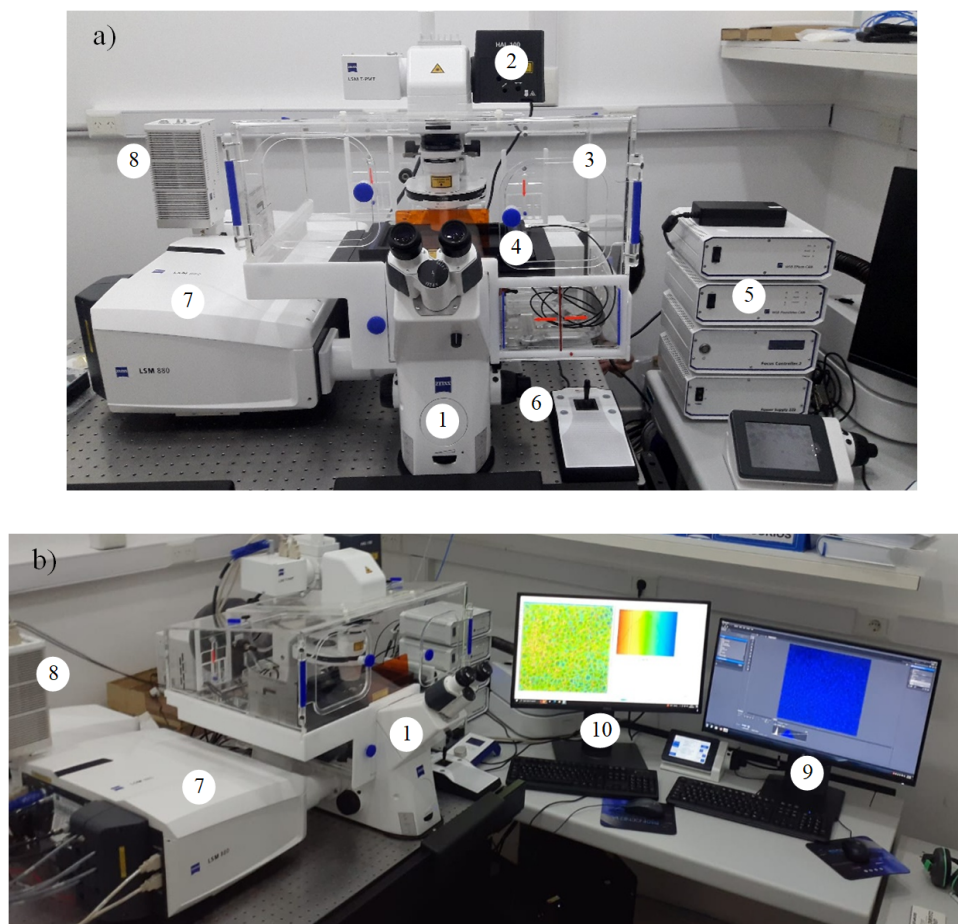


Figura 2: Plataforma Laser Confocal LSM880 – Carls Zeiss. a) Microscopio invertido con incubadora y sistemas de control. b) Microscopio y monitores de control. 1: Estativo, 2: Lámpara UV, 3: Incubadora, 4: Platina, 5: Controles, 6: Controles XY platina, 7: Cabezal confocal con PMT internos, 8: Detectores BIG2 para FLIM, 9: Monitor de Control del Microscopio, 10: Monitor de control del sistema FLIM.

Imágenes y cuantificación de FLIM

Los datos de FLIM pueden analizarse tanto en el dominio del tiempo como en el dominio de la frecuencia. Para el primer caso, una vez identificada la capa del EPR como se describió anteriormente, se inicializa el módulo del microscopio para realizar FLIM. Para ello se configuraron los parámetros de adquisición, principalmente velocidad de barrido y tiempo de adquisición. Para medir el tiempo de vida de los fluoróforos endógenos se excitó el EPR con el láser pulsado de 405 nm. Para obtener una óptima señal (número de fotones adecuados) las imágenes de 512 x 512 fueron capturadas durante 120 segundos. La autofluorescencia se detectó por dos fotomultiplicadores ultrarápidos y sensibles GaAsP PMT (BIG 2 – Figura 2), con la siguiente configuración del filtro de detección: Canal 1(420 - 480 nm) y Canal 2 (500 - 550 nm). Resumiendo, se excitó con 405 nm y se capturó la señal con los dos canales. La figura 3 muestra un ejemplo de captura trabajando con láser de 405 nm y Canal 1.

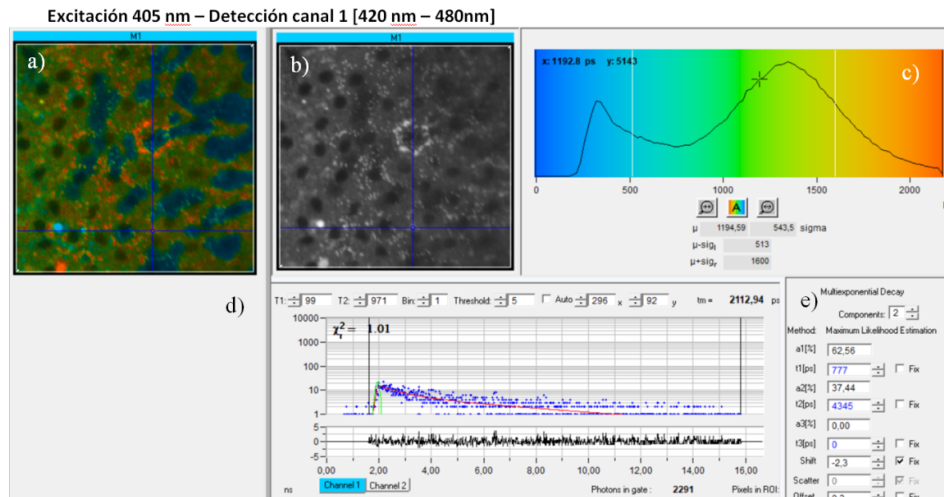


Figura 3: Representación gráfica obtenida utilizando el programa de análisis SPCImage. a) Imagen del tiempo de vida de la fluorescencia al excitar con el láser pulsado de 405 nm durante 120 segundos (canal 1). Imagen 512x512, lente 63X. Colores azules representan tiempos de vidas cortos y los naranjas tiempos de vida altos. b) Imagen de intensidad de la autofluorescencia. c) histograma de los tiempos de vida de la imagen a. Se pueden observar dos picos marcados, uno a 350 picosegundos y otro a 1400 picosegundos. d) curva del decaimiento exponencial de la fluorescencia, en azul los pixeles medidos durante 120 segundos en el pixel indicado (cruce de líneas azules) en la imagen a, la curva roja indica el ajuste realizado por el programa. Un buen ajuste se verifica con el valor del parámetro chi-cuadrado (χ^2) que debe ser próximo a uno. e) valores obtenidos de la aproximación biexponencial seleccionada. Se observan los valores para τ_1 y τ_2 y sus respectivas contribuciones a_1 y a_2 del pixel seleccionado (cruce de líneas azules).

El decaimiento de la fluorescencia se detectó utilizando el conteo de fotones individuales correlacionados con el tiempo (TCSPC) utilizando una Placa SPC 150 (Becker & Hickl GmbH). Se registraron imágenes de decaimiento de fluorescencia en tres posiciones para cada ojo analizado. Una vez finalizada la adquisición de los datos, la medición original se guardó y fue luego analizada con el software de análisis SPCImage versión 8.0 (Becker & Hickl GmbH).

La curva de decaimiento de la vida media de cada píxel se ajustó a un modelo de decaimiento exponencial doble según,

$$F(t) = a_1 \exp(-t/\tau_1) + a_2 \exp(-t/\tau_2)$$

donde $F(t)$ es la intensidad de fluorescencia en el tiempo t después de que la excitación del láser ha cesado, τ_1 y τ_2 son los tiempos de vida de los componentes de decaimiento (τ_1 es el componente de vida corta y τ_2 es el componente de vida larga), a_1 y a_2 son las contribuciones relativas de los distintos componentes (es decir, $a_1 + a_2 = 100\%$). El software utiliza estos valores para construir mapas de vida media de colores falsos asignando a cada píxel en la imagen un color de acuerdo con su valor de vida (azul y naranja representan un tiempo de vida de fluorescencia más bajo y más alto, respectivamente). Además de todas las amplitudes y tiempos de vida individuales, es importante evaluar la vida media τ_m de las imágenes de FLIM del EPR, la cual se determina como,

$$\tau_m = (a_1 \cdot \tau_1 + a_2 \cdot \tau_2) / (a_1 + a_2)$$

Para lograr comparaciones válidas, los parámetros de FLIM (τ_1 y τ_2 con sus respectivas contribuciones; así como también los valores del tiempo de vida medio τ_m de cada uno de ellos), se determinaron para los píxeles de los 4 ROI de las esquinas y 4 ROI más centrales de una cuadrícula de 4x4. El procedimiento se repitió para ocho animales, el promedio $\pm$ el desvío estándar de cada una de las variables medidas (τ_1 , τ_2 , τ_m y sus respectivas contribuciones) se utilizó como referencia de los tiempos de vida de los fluoróforos del EPR de ratones normales.

Método de Fasores

Describe el decaimiento de la fluorescencia en cada píxel mediante solo dos números: la fase y la amplitud del primer componente de Fourier.

Los datos de fase y amplitud pueden representarse y analizarse de manera elegante mediante el enfoque del método de fasores desarrollado por el grupo de Enrico Gratton. Para cada píxel, se define un vector (el “phasor”) que se muestra en un gráfico polar. La fase se utiliza como el ángulo del vector, y el grado de modulación como la amplitud [10, 11]. Este “gráfico de fasores” presenta varias características notables:

- Los fasores de los píxeles con perfiles de decaimiento monoexponencial se ubican en un semicírculo. La posición en el semicírculo depende del tiempo de vida de la fluorescencia.
- Los fasores que representan combinaciones de varios componentes de decaimiento son combinaciones lineales de los fasores de los componentes individuales.
- Los fasores de los píxeles con perfiles de decaimiento multiexponencial, es decir, sumas de varios componentes de decaimiento, terminan dentro del semicírculo.
- Los píxeles con valores similares de amplitud y fase forman agrupaciones en el gráfico de phasor. Así, los píxeles con firmas de decaimiento similares pueden identificarse en el gráfico de fasores y combinarse para un análisis más detallado o para ser anotados nuevamente en la imagen.

El análisis de fasores utiliza directamente la fase y el grado de modulación para separar o identificar fluoróforos o fracciones de fluoróforos, y para determinar las proporciones de concentración de diferentes fracciones de fluoróforos. El principio del enfoque de fasores se muestra en la siguiente figura.

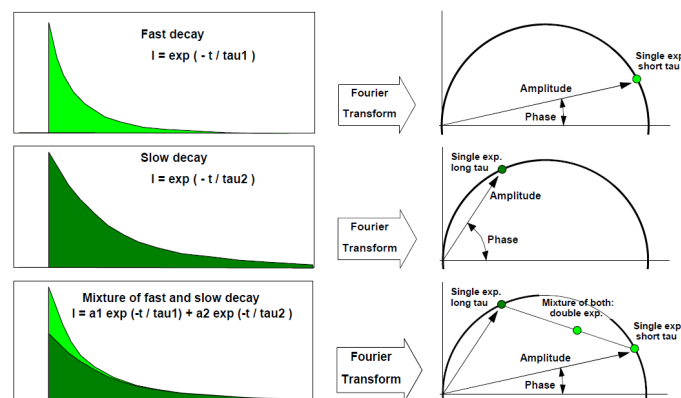


Figura 4: Relaciones entre las funciones de decaimiento en el dominio del tiempo (izquierda) y los fasores en el dominio de la frecuencia (derecha).

A continuación se presenta el método de fasores aplicado al EPR

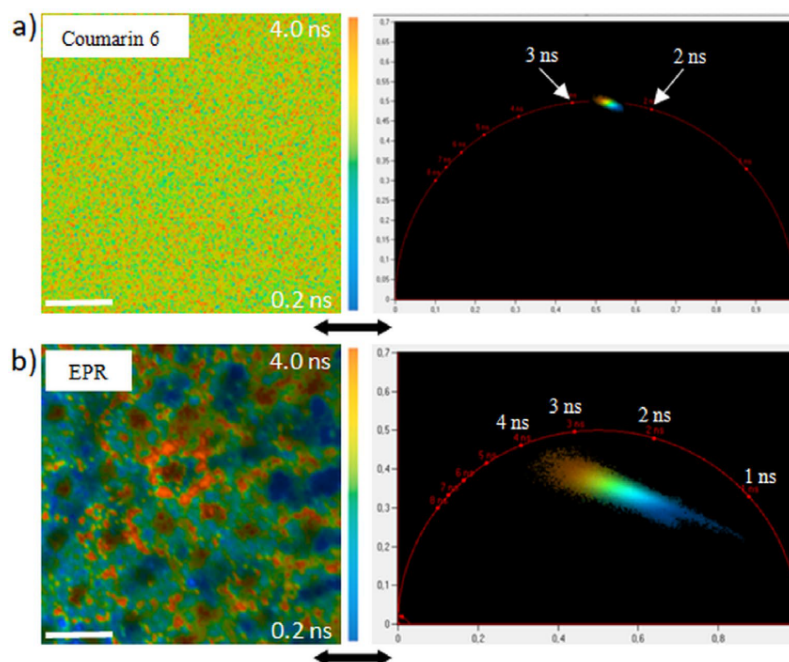


Figura 5: Enfoque fasorial. (a) Análisis de cumarina 6 utilizado para la calibración. Imagen FLIM (panel izquierdo) y diagrama fasorial (panel derecho). Las especies de vida media única se encuentran en el semicírculo. (b) Imagen FLIM de EPR transescleral representativa (panel izquierdo) y diagrama fasorial (panel derecho). Las especies complejas se encuentran dentro del semicírculo.

Modelo murino de retinopatía diabética

Para estudiar la patología de retinopatía diabética en un modelo murino, se realizó una inyección intraperitoneal de streptozotocina (STZ) 40 mg/kg por 3 semanas consecutivas, para lograr una hiperglucemia moderada, sostenida en el tiempo y sin mayores complicaciones [12]. Finalizado el tratamiento, se evaluaron 3 casos y 3 controles cada 4 semanas. Para los controles se inyectó solución fisiológica a igual volumen y frecuencia. El siguiente diagrama [Figura 6] muestra en forma resumida el procedimiento seguido y los puntos temporales donde los animales fueron sacrificados y se obtuvieron las imágenes de FLIM.

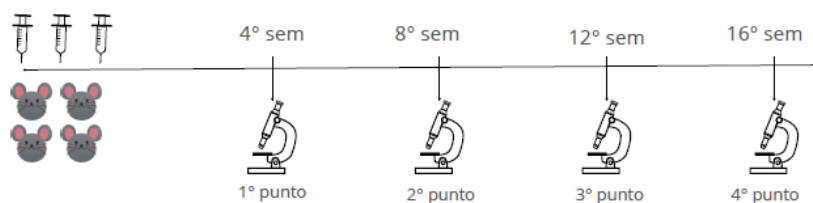


Figura 6: Protocolo de inducción de retinopatía diabética.

En la siguiente tabla se presentan los resultados arrojados en una de las pruebas del modelo. Se presenta el punto de lectura, peso del animal y valor de glucemia para animales controles y casos (inyectados con streptozotocina). Valores superiores a los 110 mg/dl son indicadores de valores altos de glucemia.

Tabla 1: Valores de glucemia para animales controles y casos

CONTROL			CASOS		
Punto	Peso [gr]	Glucemia [mg/dl]	Punto	Peso	Glucemia
Semana 4	29	69	Semana 4	28,5	80
Semana 4	30	49	Semana 4	29	105
Semana 4	29,5	73	Semana 4	30	95
Semana 8	30	77	Semana 8	31	133
Semana 8	30	94	Semana 8	32	120
Semana 8	31	43	Semana 8	30	98
Semana 12	31	106	Semana 12	31,5	114
Semana 12	30	78	Semana 12	32	112
Semana 12	31	86	Semana 12	32	100
Semana 16	28,5	131	Semana 16	32,5	98
Semana 16	30	78	Semana 16	30	114
Semana 16	ND	ND	Semana 16	31	86

RESULTADOS

Imágenes y cuantificación morfológica de la retina murina

Con el sistema de microscopia descrito se capturaron imágenes de las distintas capas del globo ocular, se realizaron representaciones tridimensionales y finalmente imágenes del epitelio retinal (EPR). A continuación se presentan imágenes representativas obtenidas con el montaje transescleral (512 × 512 píxeles, Plan-Apocromático 63×, objetivo de inmersión en aceite N.A. 1,4) con excitación láser continua a una longitud de onda de 405 nm, divisor de haz 405 y filtro de emisión PB de 410–580 nm. Al modificar la profundidad axial mediante un controlador Z, se observa desde la superficie externa de la esclerótica (a y b), pasando por la coroides (c y d), hasta la capa del epitelio pigmentario de la retina (EPR) (e y f). La separación entre imágenes fue de 9 µm. Profundidad total: 53 µm. Barra de escala blanca = 20 µm. Los valores de intensidad de los píxeles se muestran en una escala de grises de 8 bits (0 = negro, 255 = blanco). (g) Reconstrucción 3D del EPR. Imágenes en pila Z (30 secciones ópticas: imagen de 512 × 512 píxeles, objetivo Plan-Apocromático de inmersión en aceite de 63×, apertura numérica de 1,4, paso Z de 0,5 µm). Barra blanca de escala = 20 µm. (h) Secciones XZ, barra blanca de escala = 12 µm.

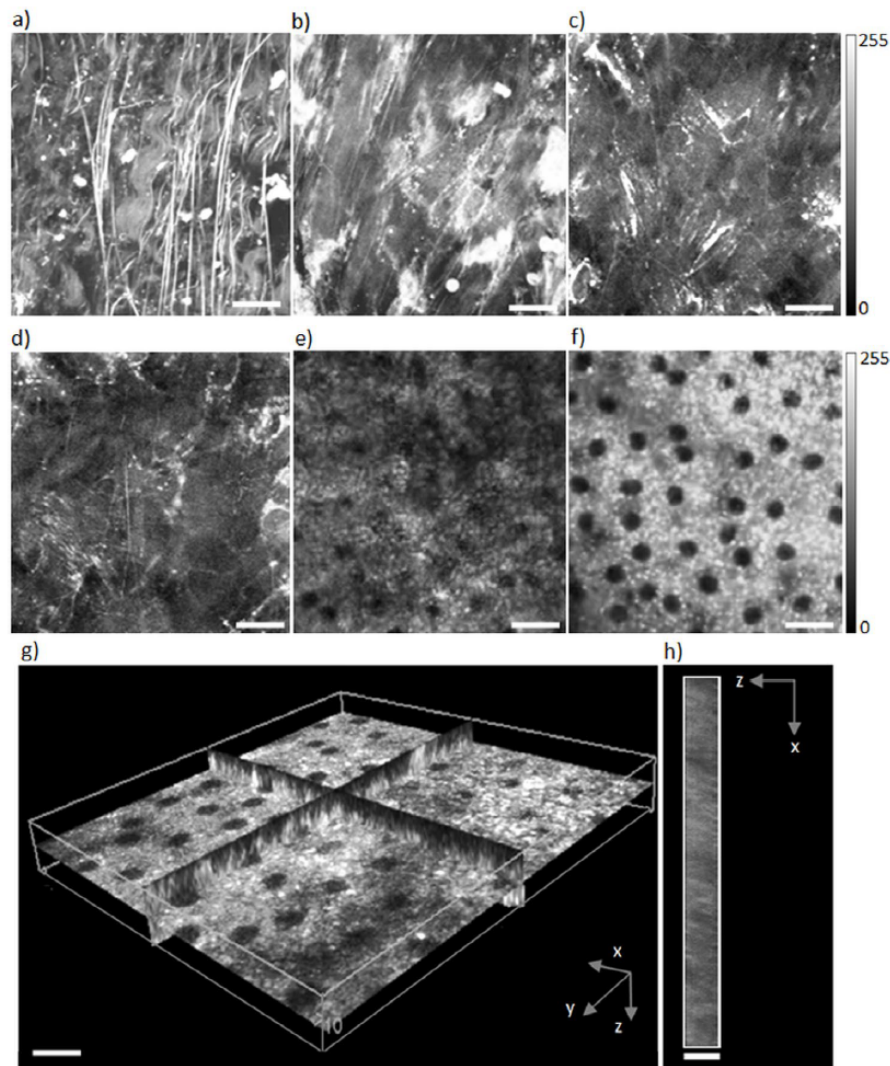


Figura 7: Imágenes de las distintas capas del globo ocular (a-f) y representación tridimensional del epitelio retinal (g)

Si bien por las características y apariencias de las células observadas en las imágenes e y f anteriores, se dedujo que las mismas pertenecen al EPR; se decidió realizar la técnica de montaje plano (utilizada para solo visualizar el EPR) para verificar los resultados. La figura 8 presenta, para comparación, las imágenes obtenidas observando el globo ocular completo con la configuración transescleral y la obtenida del montaje plano.

En ambas imágenes se observa la monocapa de células hexagonales mono, bi y multinucleadas propias del EPR. En la figura a, al tratarse del globo ocular completo, la concavidad del EPR no permite apreciar las uniones intercelulares con la definición propia del montaje plano (b). A su vez la imagen a presenta la autofluorescencia característica del EPR, siendo ésta modificada por la fijación con PFA en la figura b.

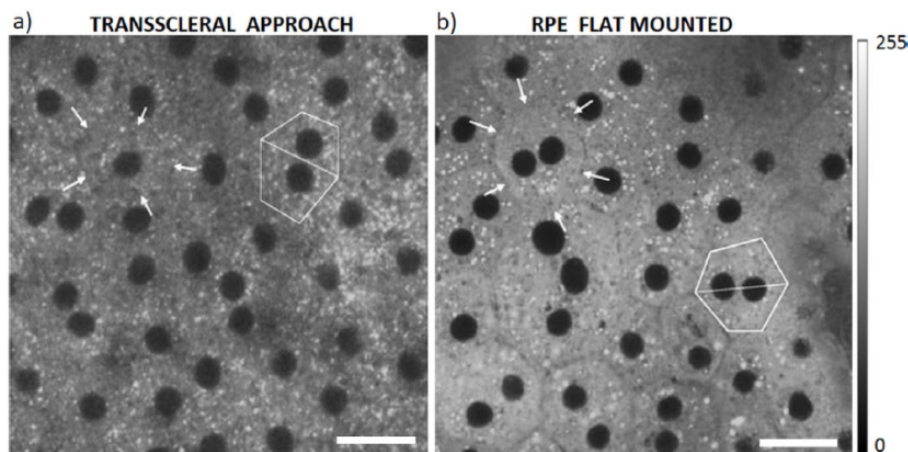


FIGURA 8: Imágenes confocales representativas (512 × 512 píxeles, Plan-Apocromático 63x, objetivo de inmersión en aceite N.A. 1,4) con excitación láser continua de longitud de onda de 405 nm del EPR, divisor de haz 405, filtro de emisión PB 410–580 nm. (a) Abordaje transescleral (b) Montaje plano.

Con la experiencia y descripción anterior, confirmamos que podemos observar el EPR utilizando láseres continuos y una aproximación transescleral. Para reforzar los estudios, se realizaron cuantificaciones morfométricas sobre las imágenes. Utilizando el programa ImageJ y el plugin Analizar --- Medir, se cuantificó: el espesor del EPR y las características morfológicas (área, diámetro y perímetro) de las células epiteliales (Tabla 2). Los resultados obtenidos son coincidentes con lo establecido en la bibliografía [13]. Las mediciones fueron llevadas a cabo sobre 8 ojos y las cuantificaciones se tomaron en 4 células por imagen, habiendo obtenido 3 imágenes por cada ojo; dando un total de 96 mediciones.

Tabla 2: Valores morfológicos de las células epiteliales de la retina

EPR	Área [μm^2]	Desvío Estándar	Perímetro [μm]	Desvío Estándar	Diámetro [μm]	Desvío Estándar	Espesor [μm]	Desvío Estándar
Transescleral	460,67	172,43	79,79	14,44	23,35	5,43	11,8	3,1
Montaje Plano	477,84	148,11	81,89	12,66	25,52	4,71		

Imágenes de FLIM y cuantificación por fasores

Una vez localizado el epitelio retinal se realizaron imágenes de FLIM para identificar (utilizando fasores) los tiempos de vida de los fluoróforos de la retina normal (Figura 9 y Tabla 3). Luego se aplicó el mismo método para el estudio de la retinopatía diabética (Figura 10).

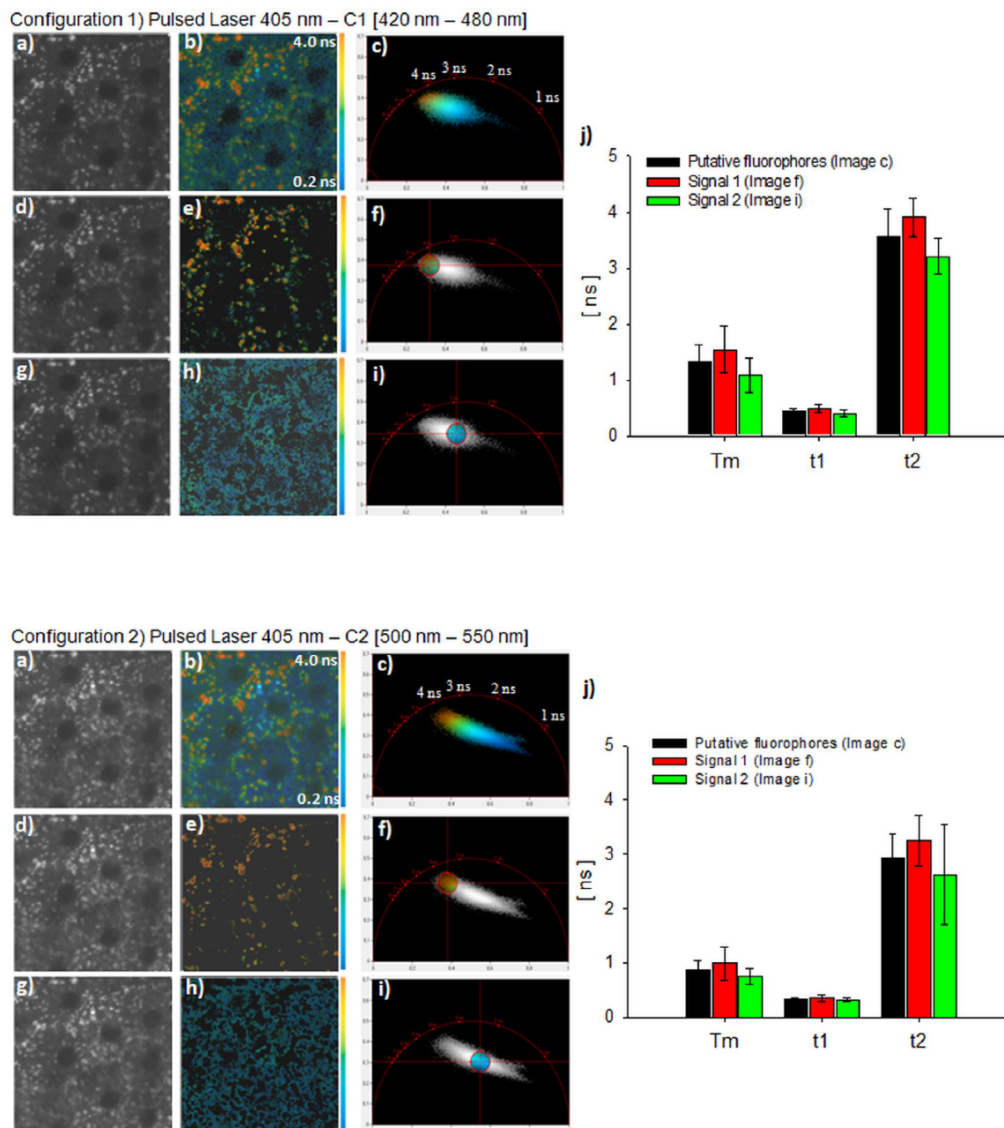


FIGURA 9: Dos configuraciones utilizadas para obtener imágenes de tiempo de vida de fluorescencia. Cada configuración (C1 y C2) muestra regiones de interés (ROI) representativas utilizadas para calcular el tiempo de vida de fluorescencia. En total, se utilizaron cinco ROI, una por cada ojo. (a, d, g) Imágenes en escala de grises. (b, e, h) Mapas de tiempo de vida, escala de colores. (Los colores azul y naranja representan tiempos de vida de fluorescencia cortos y largos, respectivamente). (c, f, i) Representaciones de diagramas fasoriales. (b, c) Muestra todos los píxeles en la ROI. (e) Muestra todos los píxeles seleccionados por el cursor en el diagrama fasorial (f), que representan la señal 1. (h) Muestra todos los píxeles seleccionados por el cursor en el diagrama fasorial (i), que representan la señal 2. (j) Resultados del tiempo de vida de fluorescencia τ_m , τ_1 y τ_2 calculados con el procedimiento de suma de curvas de decaimiento. Cada barra representa la media $\pm$ desviación estándar. Se realizaron mediciones independientes de grupos específicos (c, f, i) en todas las regiones de interés (ROI) examinadas (n = 5). Las barras negras, rojas y verdes representan todos los píxeles (posibles fluoróforos) en la ROI, los píxeles de la señal 1 y los píxeles de la señal 2, respectivamente.

Tabla 3: tiempos de vida obtenidos en el EPR

FLIM parameters [Images: $n = 5$]						
Excitation/pulsed laser [nm]	Channel/emission [nm]	τ_m [ns]	τ_1 [ns]	a_1 (%)	τ_2 [ns]	a_2 (%)
405	C1:420–480	1.32 ± 0.32	0.45 ± 0.05	68.41 ± 4.47	3.56 ± 0.49	31.59 ± 4.47
405	C2:500–550	0.87 ± 0.17	0.34 ± 0.03	81.02 ± 3.67	2.94 ± 0.44	18.99 ± 3.70

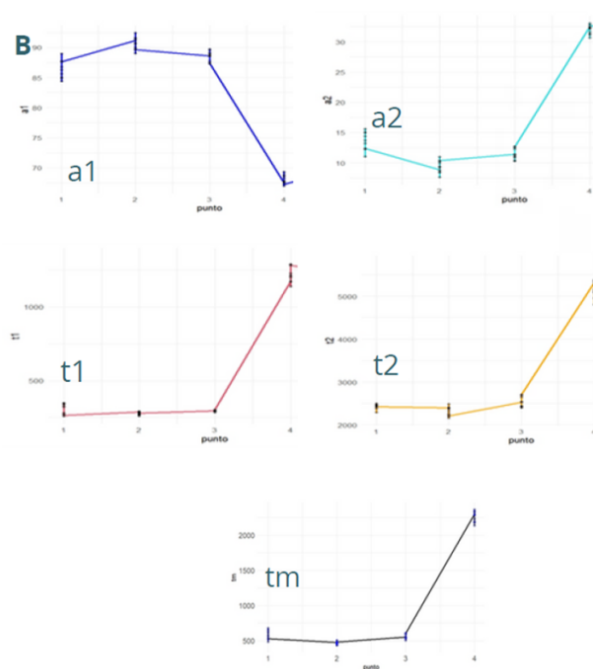
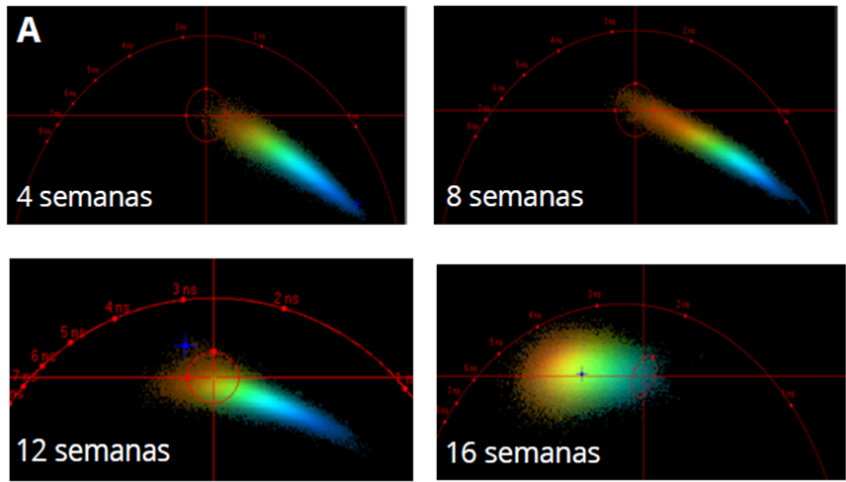


Figura 10: A) Diagrama de fasores y B) Análisis temporal en el EPR sometido a condiciones de hiperglucemia de diferentes tiempos de evolución

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Las técnicas de imagen de alta resolución capaces de detectar fluoróforos endógenos en el ojo mejorarán significativamente los estudios en oftalmología. En este trabajo,

demostramos que es posible obtener imágenes de alta calidad del epitelio pigmentario de la retina (EPR) con resolución óptima de manera no destructiva. La combinación de microscopía confocal con técnicas de imagen de tiempo de vida de fluorescencia (FLIM) [14-16]; —métodos de imagen sin marcadores— ofrece el potencial de analizar tanto la morfología como el estado bioquímico de la retina.

El abordaje al EPR se realizó de manera transescleral, lo que ofrece la ventaja de una mayor penetración en profundidad y permitió caracterizar el EPR evitando cortes y fijaciones previas del ojo. Otra ventaja es que un láser de onda continua fue suficiente para lograr la caracterización morfológica del epitelio retinal. Estudios previos obtuvieron resultados comparables, pero utilizando láseres pulsados [17-20], los cuales son varias veces más costosos y requieren una configuración óptica mucho más compleja que la utilizada en este trabajo. Nuestro sistema opera en modo de un único fotón, en lugar del modo multifotón típicamente empleado en la mayoría de otras aplicaciones con láseres Ti:safiro (TiSa) sintonizables. Los láseres TiSa, que operan en el infrarrojo, permiten una mayor penetración en tejidos biológicos. En nuestro caso, utilizando un láser visible (405 nm), demostramos que también es posible alcanzar la retina bajo esta configuración. Además de esta ventaja, el láser utilizado es considerablemente más económico y más fácil de integrar en un microscopio confocal que un láser TiSa pulsado. La principal limitación es que no podemos sintonizar la longitud de onda, como ocurre en los otros sistemas, lo que permitiría excitar diferentes fluoróforos con el mismo equipo.

Para asegurar que la señal de autofluorescencia provenía del EPR, las imágenes se compararon con otras obtenidas en preparaciones de EPR “montaje plano” (Figura 8). La morfología celular fue similar en ambos casos, con forma hexagonal y uno o dos núcleos por célula [18, 21]. Los valores de área, perímetro y diámetro fueron mayores en la imagen de EPR de montaje plano, ya que el tejido se encuentra completamente extendido, perdiendo la curvatura del globo ocular.

Para medir el tiempo de vida de fluorescencia, utilizamos un láser pulsado de 405 nm (excitación monofotónica) y FLIM para identificar posibles fluoróforos y evaluar cómo sus tiempos de vida responden al entorno fisiológico y a cambios químicos (Figura 9). La identificación inequívoca de fluoróforos individuales en el complejo entorno bioquímico del EPR es inherentemente difícil. No obstante, proponemos valores tentativos de tiempo de vida (Figura 9b, c,j, barra negra), reconociendo claramente que representan mezclas de diferentes componentes autofluorescentes y no firmas de especies moleculares individuales. Un candidato importante es la lipofuscina, reconocida como la principal fuente de autofluorescencia en el EPR [21]. Utilizando excitación a 405 nm en microscopía confocal del EPR de ratones albinos, Meleppat y colaboradores demostraron que la autofluorescencia se origina principalmente en gránulos de lipofuscina ubicados entre los núcleos y los límites laterales de las células, resultados consistentes con nuestras imágenes. Otros estudios también han confirmado que la lipofuscina puede excitarse y detectarse eficazmente a longitudes de onda similares [6, 22]. Nuestro análisis de fasores de agrupamientos tipo gránulo (señal 1) arrojó tiempos de vida medios ($T_m = 0,9\text{--}1,4$ ns) dentro del amplio rango reportado para la lipofuscina (0,07–3,0 ns). Los análisis detallados de fluorescencia resuelta en el tiempo para lipofuscina son aún escasos y presentan inconsistencias [23,24]. Por ejemplo, el grupo de Schweitzer reportó valores de T_m de aproximadamente 1,4 ns en ojos porcinos [22]. En ojos humanos sanos, se han reportado valores de T_m de 0,20–0,35 ns utilizando un ajuste de dos

componentes [25]. En otro estudio, gránulos de lipofusina extraídos con cloroformo de células de EPR humanas mostraron T_m de aproximadamente 3 ns [26]. Aunque los valores publicados varían considerablemente, nuestros resultados se encuentran dentro de estos rangos, lo que respalda a la lipofusina como un contribuyente principal a la autofluorescencia observada.

Una segunda contribución plausible puede provenir de otros fluoróforos endógenos presentes en el citoplasma del EPR, incluyendo cofactores relacionados con procesos redox como el FAD, junto con componentes asociados a la lipofusina (señal 2). El FAD (emisión 500–600 nm) puede excitarse eficientemente a 405 nm [27]. Los tiempos de vida observados en regiones citoplasmáticas y gránulos perinucleares (señal 2) mostraron $T_m = 0,8\text{--}1,0$ ns, con componentes cortos ($\sim 0,3$ ns) y largos ($\sim 2,8\text{--}3,2$ ns), valores consistentes con rangos previamente reportados para mezclas que involucran FAD libre y otros fluoróforos endógenos [23, 28, 29]. Sin embargo, debido a la superposición espectral y temporal entre especies endógenas, no es posible una asignación molecular única bajo las condiciones experimentales actuales.

En resumen, considerando las especies autofluorescentes conocidas presentes en el EPR, la configuración óptica de nuestro sistema y los tiempos de vida obtenidos (Tabla 3), concluimos que los contribuyentes más probables a la autofluorescencia excitada a 405 nm son los gránulos de lipofusina (señal 1) y componentes autofluorescentes citoplasmáticos mixtos que pueden incluir FAD junto con especies asociadas a la lipofusina (señal 2), reconociendo que se requieren estudios adicionales para una identificación molecular definitiva.

En el modelo de retinopatía diabética, los resultados obtenidos fueron de utilidad para trabajar con el método de fasores y comprobar la variación de algunos de los fluoróforos endógenos con el aumento de la glucemia. En la figura 10A, se presenta el análisis de fasores en el EPR sometido a condiciones de hiperglucemia de diferentes tiempos de evolución y en la 10B, el análisis temporal (λ_1 , λ_2 , a_1 , a_2 y λ_m). El diagrama de fasores muestra un incremento en los tiempos de vida media a partir de la semana 16. A su vez, las formas lineales de las nubes indican la presencia de dos componentes por píxel (λ_1 y λ_2), y las circulares sugieren la adición de un tercer componente (λ_3) en cada píxel. Esto podría deberse a la acumulación de productos de glicación avanzada (AGEs), indicadores de daño oxidativo por hiperglucemia. A su vez, se reduce la amplitud de λ_1 (a_1), y aumenta la de λ_2 (a_2), sugiriendo un aumento en la proporción de moléculas de FAD libres y una disminución de las moléculas de FAD unidas a proteínas. Este fenómeno es indicador de un cambio en el metabolismo celular de oxidativo a glucolítico.

En conclusión, el EPR puede evaluarse mediante microscopía monofotónica por vía transescleral. Caracterizamos la morfología celular y medimos el tiempo de vida medio de fluoróforos putativos, mostrando que estos tiempos varían según el tejido circundante y el incremento de glucosa. Esta es una técnica pensada para ser no invasiva, pero el diseño experimental utilizado —siendo el primero de una serie de experimentos que nuestro laboratorio está realizando en oftalmología con esta tecnología— ha requerido la enucleación. Actualmente estamos desarrollando una línea de investigación en la que los animales permanecen vivos para evaluar cambios a lo largo del tiempo.

Indicadores de Producción

Publicaciones con referato

- Dominguez L, Etchart J, Torres RM, Adur J. Innovative Transscleral Approach to Obtain High Quality Non-Destructive Images of the Retinal Pigment Epithelium. *Microscopy Research and Technique*, 2026; 0:1–12. <https://doi.org/10.1002/jemt.70133>
- Michell A, Adur J, Caviglia OP, Sadras VO, Ré DA. Phenotypic plasticity of field pea (*Lathyrus oleraceus* L.) nodule morphology and cell-wall lignin in response to water and photothermal regimes. *Rhizosphere* 37. 101273. <http://doi.org/10.1016/j.rhisph.2026.101273>

Premios y distinciones

- 1° Puesto con la presentación del trabajo científico “Detección de cambios metabólicos en el epitelio pigmentario retinal con microscopia de tiempo de vida de fluorescencia (FLIM)”, en la categoría Investigación dentro de la Jornada Regional CAO Litoral 2024

Presentaciones a congresos nacionales

- Presentación de trabajo en las Jornadas Regionales del Consejo Argentino de Oftalmología Litoral 2024. Santa Fe
- Presentación de trabajo, en Congreso Nacional de Oftalmología CON 2025, Buenos Aires.

REFERENCIAS

- [1] Díaz NM, Morera LP, Guido ME. Melanopsin and the Non-visual Photochemistry in the Inner Retina of Vertebrates. *Photochem Photobiol.* (2016); 92(1):29-44.
- [2] Wang W, Lo ACY. Diabetic Retinopathy: Pathophysiology and Treatments. *Int J Mol Sci.* (2018); 19(6):1816.
- [3] Sabanayagam C, Banu R, Chee ML, et al. Incidence and progression of diabetic retinopathy: a systematic review. *Lancet Diabetes Endocrinol.* (2019); 7(2):140-149.
- [4] High Resolution Imaging in Microscopy and Ophthalmology. *New Frontiers in Biomedical Optics*. Edit Josef F. Bille. Springer (2019).
- [5] Adur J, Barbosa GO, Pelegati VB, Baratti MO, Cesar CL, Casco VH, Carvalho HF. Multimodal and non-linear optical microscopy applications in reproductive biology. *Microsc Res Tech.* (2016); 79(7):567-582.
- [6] Dysli C, Wolf S, Berezin MY, Sauer L, Hammer M, Zinkernagel MS Fluorescence lifetime imaging ophthalmoscopy. *Prog Retin Eye Res.* (2017); 60:120-143. [13] W Becker. Fluorescence lifetime imaging-techniques and applications. *J Microsc.* (2012); 247(2):119-136.
- [7] W Becker. Fluorescence lifetime imaging-techniques and applications. *J Microsc.* (2012); 241(2):119-136.
- [8] High Resolution Imaging in Microscopy and Ophthalmology. *New Frontiers in Biomedical Optics*. Edit Josef F. Bille. Springer (2019).
- [8] Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research, from the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO). https://www.arvo.org/About/policies/statement-for-the-use-of-animals-in-ophthalmic-and-vision_research (acceso 18/7/2020).
- [9] Claybon A, Bishop AJ. Dissection of a mouse eye for a whole mount of the retinal pigment epithelium. *J Vis Exp.* (2011) 27;(48):2563. doi: [10.3791/2563](https://doi.org/10.3791/2563).
- [10] M.A. Digman, V.R. Caiolfa, M. Zamai, E. Gratton. The phasor approach to fluores-

- cence lifetime imaging analysis. *Biophysical J.* 94, L14-L16 (2008).
- [11] M.A. Digman, E. Gratton. The phasor approach to fluorescence lifetime imaging: Exploiting phasor linear properties. In: L.Marcu, P.W.M. French, D.S. Elson, *Fluorescence lifetime spectroscopy and imaging*. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton (2015)
 - [12] Furman, B.L. Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats. *Curr. Protoc. Pharmacol* (2015). 70:5.47.1-5.47.20.doi: [10.1002/0471141755.ph0547s70](https://doi.org/10.1002/0471141755.ph0547s70).
 - [13] Von der Emde L. Histologic Cell Shape Descriptors for the Retinal Pigment Epithelium in Age-Related Macular Degeneration: A comparison to Unaffected Eyes. *Transl Vis Sci Technol.* (2022) 11(8): 19. doi: [10.1167/tvst.11.8.19](https://doi.org/10.1167/tvst.11.8.19)
 - [14] Becker, W., and C. Biskup. 2004. "Fluorescence Lifetime Imaging by Time-Related Single-Photon Counting." *Microscopy Research and Technique* 63, no. 1: 58–66. [https:// doi. org/ 10. 1002/ jemt. 10421](https://doi.org/10.1002/jemt.10421).
 - [15] Yuan, N., V. Pandey, A. Verma, et al. 2024. "Quantifying Lifetime Uncertainty in Gated ICCD Fluorescence Lifetime Imaging." *Optica Open*, preprint, December 27. [https:// doi. org/ 10. 1364/ optic aopen. 28094 186. v1](https://doi.org/10.1364/optic.aopen.28094186.v1).
 - [16] Verma, A., V. Pandey, C. Sherry, et al. 2025. "Fluorescence Lifetime Imaging for Quantification of Targeted Drug Delivery in Varying Tumor Microenvironments." *Advanced Science* 12, no. 3: e2403253. [https:// doi. org/ 10. 1002/ advs. 20240 3253](https://doi.org/10.1002/adv.202403253).
 - [17] Imanishi, Y., M. L. Batten, D. W. Piston, W. Baehr, and K. Palczewski. 2004. "Noninvasive Two-Photon Imaging Reveals Retinyl Ester Storage Structures in the Eye." *Journal of Cell Biology* 164, no. 3: 373–383. [https:// doi. org/ 10. 1083/ jcb. 20031 1079](https://doi.org/10.1083/jcb.200311079).
 - [18] Palczewska, G., J. Boguslawski, P. Stremplewski, et al. 2020. "Non-Invasive Two-Photon Optical Biopsy of Retinal Fluorophores." *Proceedings of the National Academy of Science USA* 117, no. 36: 22532-22543. [https:// doi. org/ 10. 1073/ pnas. 20075 27117](https://doi.org/10.1073/pnas.2007527117).
 - [19] Miura, Y. 2018. "Two-Photon Microscopy (TPM) and Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (FLIM) of Retinal Pigment Epithelium (RPE) of Mice in Vivo." In *Methods in Molecular Biology*, 73–88. Humana Press Inc. [https:// doi. org/ 10. 1007/ 978-1- 4939-7720-8-5](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7720-8-5).
 - [20] Kesavamoorthy, N., J. Junge, S. Fraser, and H. Ameri. 2022. "Insights Into Metabolic Activity and Structure of the Retina Through Multiphoton Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy in Mice." *Cells* 11, no. 15: 2265. [https:// doi. org/ 10. 3390/ cells 11152265](https://doi.org/10.3390/cells11152265).
 - [21] Meleppat, R. K., K. E. Ronning, S. J. Karlen, et al. 2020. "In Situ Morphologic and Spectral Characterization of Retinal Pigment Epithelium Organelles in Mice Using Multicolor Confocal Fluorescence Imaging." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 61, no. 13: 1. [https:// doi. org/ 10. 1167/ iovs. 61. 13. 1](https://doi.org/10.1167/iovs.61.13.1).
 - [22] Schweitzer, D., S. Schenke, M. Hammer, et al. 2007. "Towards Metabolic Mapping of the Human Retina." *Microscopy Research and Technique* 70, no. 5: 410–419.
 - [23] Miura, Y., P. S. Bernstein, C. Dysli, L. Sauer, and M. Zinkernagel. 2019. "Chapter 7 Fluorophores in the Eye." In *Fluorescence Lifetime Imaging Ophthalmoscopy*, edited by M. Zinkernagel and C. Dysli. Springer.
 - [24] Tang, J. A. H., C. E. Granger, K. Kunala, et al. 2022. "Adaptive Optics Fluorescence Lifetime Imaging Ophthalmoscopy of in Vivo Human Retinal Pigmente Pithelium." *Biomedical Optics Express* 13, no. 3: 1737. [https:// doi. org/ 10. 1364/ boe. 451628](https://doi.org/10.1364/boe.451628).

- [25] Dysli, C., M. Dysli, V. Enzmann, S. Wolf, and M. S. Zinkernagel. 2014. "Fluorescence Lifetime Imaging of the Ocular Fundus in Mice." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 55, no. 11: 7206–7215. <https://doi.org/10.1167/iov.14-14445>.
- [26] Yakovleva, M. A., T. B. Feldman, P. M. Arbukhanova, S. A. Borzenok, V. A. Kuzmin, and M. A. Ostrovsky. 2017. "The Fluorescence Lifetime of Lipofuscin Granule Fluorophores Contained in the Retinal Pigment Epithelium Cells From Human Cadaver Eyes in Normal State and in the Case of Visualized Pathology." *Doklady Biochemistry and Biophysics* 474, no. 1: 239–243. <https://doi.org/10.1134/S1607672917030231>.
- [27] Wang, M., F. Tang, X. Pan, et al. 2017. "Rapid Diagnosis and Intraoperative Margin Assessment of Human Lung Cancer With Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy." *BBA Clinical* 8: 7–13. <https://doi.org/10.1016/j.bbacli.2017.04.002>.
- [28] Nakashima, N., K. Yoshihara, F. Tanaka, and K. Yagi. 1980. "Picosecond Fluorescence Lifetime of the Coenzyme of D-Amino-Acid Oxidase." *Journal of Biological Chemistry* 255: 5261–5263.
- [29] Maskevich, A. A., I. M. Artsukevich, and V. I. Stepuro. 1997. "Fluorescent Properties of the Alcohol Oxidase Prosthetic Group and Their Relationship to the Functional State of Proteins." *Journal of Molecular Structure* 408-409:261–264.

PID 6237

Denominación del Proyecto:

Microscopia óptica avanzada aplicada al estudio de la retina. Análisis de su posible utilización como herramienta de diagnóstico de patología ocular

Unidad de ejecución

Universidad Nacional de Entre Ríos

Dependencia

Facultad de Ingeniería

Cátedra, Área o disciplina científica

Laboratorio de Microscopia Aplicada a Estudios Moleculares y Celulares (LMAE)

Contacto: javier.adur@uner.edu.ar

Integrantes del proyecto

Director/a

Adur Javier Fernando

Codirector/a externo

Torres Rodrigo Martín
(Consejo Argentino de Oftalmología: Buenos Aires, Argentina)

Integrantes internos/docentes UNER

María Fernanda Izaguirre.
Becaria CONICET: Domínguez, Lucía.
Becarias/os vinculadas al PID: Facundo Sabater.

Fecha de inicio y finalización efectivas:

01/03/2023 y 28/02/2026

Aprobación del Informe Final mediante resolución C.S. N° 123/26 (02/07/2026)