ESCUELA DE
DOCTORADO
INTERNACIONAL DE LA
USC

Andrea
Cuartero Martínez

Tesis doctoral

Implementación de técnicas de imagen y biomarcadores proteómicos en la caracterización preclínica de patologías oftálmicas y neurodegenerativas

Programa de doctorado en Investigación y Desarrollo de Medicamentos

TESIS DOCTORAL

IMPLEMENTACIÓN DE TÉCNICAS DE IMAGEN Y BIOMARCADORES PROTEÓMICOS EN LA CARACTERIZACIÓN PRECLÍNICA DE PATOLOGÍAS OFTÁLMICAS Y NEURODEGENERATIVAS

Andrea Cuartero Martínez

Directores:

Anxo Fernández Ferreiro,

Marcos Ortega Hortas

Francisco Javier Otero Espinar

Tutor:

Francisco Javier Otero Espinar

PROGRAMA DE DOUTORAMENTO EN INVESTIGACIÓN E DESENVOLVEMENTO DE MEDICAMENTOS

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2024

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Conflicto de interés

El doctorando, Andrea Cuartero Martínez, declara
no tener ningún conflicto de intereses en relación con esta Tesis Doctoral.

Fdo. Andrea Cuartero Martínez

AGRADECIMIENTOS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

AGRADECIMIENTOS

Escribo estas líneas un 22 de agosto del 2024, cuando hace exactamente 3 años, 3 meses y 12 días que me dieron la noticia de que iba a realizar el doctorado. 1200 días donde el entusiasmo, el trabajo, la constancia, la alegría y los miedos han sido protagonistas de la vida de una óptica que soñaba desde pequeña poder parecerse un poco a esos investigadores que veía en la televisión los sábados noche. Este camino no lo he realizado en solitario, he tenido la suerte de acompañarme de gente maravillosa que me ha apoyado y me ha brindado bienestar, ayuda y confianza. Por ello, quiero agradecerles el haber estado durante mi Tesis y haber contribuido a ese sueño infantil.

Primero de todo, quería agradecer a mis tres directores de Tesis, **Anxo, Marcos y Fran**, por confiar en mí y guiarme durante todo el camino.

Anxo, gracias por ver en mi a una persona válida. Me has contagiado la pasión, el optimismo y la resiliencia por la investigación. Has sido capaz de dirigirme y motivarme en los momentos más complicados. Gracias por todo lo que me has brindado, por aceptarme en tu grupo como una más, por esta oportunidad y por la confianza que depositaste en una alumna que tímidamente te confió su deseo de empezar en la investigación. Espero poder haber llegado a la altura de tus expectativas.

Marcos, por todo el apoyo y facilidades que me has brindado en este periodo de tesis. No es fácil tener fe ciega en algo que no ves a diario. Has sido una parte importante de este camino y sé que no podría haberlo completado así sin tu ayuda. Gracias.

Fran, la gente no se equivoca al describirte. Gracias por acogerme como director y como tutor. Me has acompañado en cada paso de esta aventura con empatía, amabilidad y paciencia. Me has permitido entrar en tu grupo y poder aprender de tu forma de ser y tu forma de trabajar. Tu interés y predisposición para enseñarme y explicarme todas mis dudas han provocado que pueda decir con orgullo que has formado a una 'mini farmacéutica' y que nunca voy a olvidar lo agradecida que estoy contigo por guiarme y enseñarme de esa manera.

Si os preguntarais a qué grupo de investigación pertenezco, probablemente se obtendrían respuestas muy dispares ya que he podido tener la suerte de trabajar y

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

embeberme de mucha gente. Es difícil recoger todo el amor y cariño en unas pocas líneas, pero espero poder realizarlo de la mejor manera posible.

En primer lugar, me gustaría agradecer a **Miguel Barcia** por tu dedicación y apoyo en estos años. Gracias a tu cercanía y buena predisposición, hablar y debatir contigo siempre es un chute de conocimiento. A los compañeros de laboratorio de la Facultad de Farmacia, muchas gracias por las risas y por las enseñanzas recibidas. En especial, **Victoria**, gracias por la paciencia y el apoyo desinteresado, pocas veces se puede tener la suerte de encontrarse con gente como tú en el camino.

Si hay unas personas las cuales estoy altamente agradecida de haber conocido y haber trabajado son mis compañeros del grupo **FarmaCHUSLab**. Difícilmente podría haber realizado todo esto sin su apoyo incondicional y su buen querer. **Olga, Patri, Marta, Diana y Cañizo**, por todos los consejos y las risas compartidas. **Kike**, por celebrar conmigo lo bueno y apoyarme en lo malo. A la chulita más lianta, **Carol**, viniste siendo solamente una chica de prácticas que ponía géneros a los instrumentos y con el tiempo te has convertido en un apoyo fundamental en el grupo. Me alegra saber que hemos aprendido la una de la otra. A **Jesús y Lorena**, papá y mamá si me preguntasen. Me habéis enseñado el tipo de científica que quiero ser. Gracias por todas las conversaciones y enseñanzas impartidas, no solamente científicas sino también humanas. A **Iria**, tus abrazos y tu optimismo consiguen alegrar el corazón a cualquiera. **Laura**, contigo el tiempo y la distancia parece que no hacen efecto. Gracias por todo el tiempo y confidencias. A **Kiko**, quién me iba a decir que el mejor residente de España iba a traerme huevos para un experimento, tampoco que iba a cogerle tanto cariño en este tiempo. Has sido todo un descubrimiento, gracias por todo el apoyo, las risas y los descansos. Gracias. **Cristina**, gracias por acogerme con el cariño y el apoyo incondicional. Desde los cafés en el CIMUS hasta las charlas en nuclear, gracias por orientarme y ayudarme en todo lo que he necesitado. Cuando llegué al laboratorio me sentaron en medio de dos grandes personas que siempre van a tener un espacio en mi corazón, un asiento en mi mesa y por los cuales dejo todo, mis **chulis del 8**. **Gonzalo**, eres capaz de sacarme una sonrisa hasta en los peores momentos. Me has enseñado todo lo que sé de cromatografía y solo espero que te sientas orgulloso de verme crecer gracias a ti. **Ana**, no tengo palabras para describir la suerte que tuve al empezar a trabajar contigo. Hemos batallado muchas, tanto profesional como personalmente. Contigo tengo un tesoro, eres un ejemplo para seguir. Gracias por tu asertividad, por celebrar conmigo todos mis logros, aguantarme y apoyarme en mis momentos más duros y por hacer de hombro cuando lo he necesitado. Gracias por tu amistad.

Sois el ejemplo perfecto de un gran grupo, de buenos compañeros y buenas personas. Gracias por todo.

A mis compañeros del grupo de Imagen, **Pablo, Lara, Jessica, María y Claudia**. Parte de esta tesis la he realizado bajo vuestro techo, gracias por la ayuda. Sois parte indispensable de esto también. En especial, agradecer a dos personas las cuales me han enseñado todo lo que se de ese mundo, esta tesis es también vuestra, espero os guste. **Noemí**, tu buen hacer y tu empatía hacia los animales me han ayudado a ser mejor científica y persona. Gracias por hacer fácil lo que no lo era y por calmarme en mis momentos más tensos, te has preocupado como madre y como amiga y no puedo estar más agradecida. Espero haberte devuelto una parte de lo que tú has hecho por mí. **Xurxo**, gracias por actuar como hermano mayor. Desde el primer día hasta el último de este camino has estado a mi lado brindándome apoyo, empatía y alegría. Qué suerte la mía. Te considero no solo un gran compañero, sino también un gran amigo. Gracias.

Por otra parte, todos necesitamos a esas personas que nos acompañan en el camino y nos motivan a ser mejores personas:

A las nano chicas, **Laura, Nere, Sori, María, Irene,** y **Emma.** Solo puedo decir que sois majísimas. Me habéis demostrado y hecho sentir este corto tiempo la definición de grandes amigas. Me habéis escuchado en todo lo que he necesitado y os habéis preocupado en todo, queriendo estar presente siempre. Que guay haber compartido ese viaje juntas, os tengo guardadas en un cachito de mi ser. Gracias. **María**, has sido una de las personas más guais que me ha traído esta tesis. Eres buena persona, cariñosa y dulce. Contigo las alegrías se duplican y se reducen las angustias. **Irene**, *yo realmente aún no sé quién eres*, pero tenemos algo en común. Contigo es alegría asegurada, gracias por ser y estar. A **Emma**, que decirte. Es difícil resumir en pocas líneas todo lo vivido y lo agradecida que estoy de ello. Me has empujado en todo lo que he necesitado, has vivido mis logros como tuyos y también mis fracasos. Gracias por reír conmigo y por calmarme cuando lo he necesitado. Eres casa.

A **Hugo, Jacobo, Belén y Vero**. Qué guay y que agradecida estoy de que me acogierais con vosotros. Sois bondad pura. Gracias por todos vuestros consejos y vuestras risas y gracias por sentir como vuestros mis logros y por saber que puedo contar con vosotros siempre que lo necesite. **Paula**, que suerte y que afortunada soy de tener una amiga como tú. Siempre has estado para mí en todo, ya sea desde Oia, Santiago, Huelva o Navarra. Gracias por las caminatas para llegar a los pasos, por las visitas al super, por las tardes y noches de confidencias en la cama y por dejarme ser. A **Marius, Garcés y**

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

Noelia, *vaya tres patas para un banco*. Se dice que siempre se acaba volviendo a los orígenes y yo siempre quiero volver con vosotros, sois apoyo y aceptación. Sois esa familia que se escoge y escogería mil veces.

A **Sara, David, Patri y Alejandro**. Miradme, ya está, fin. Quien nos iba a decir que del laboratorio iba a salir gente tan preciada como vosotros. Gracias por estar, por aguantar los minutos de monólogos constantes y por animarme y apoyarme durante todo el camino. Sois los mejores. Espero que os sintáis igual de orgullosos de llamarme amiga vuestra como lo soy yo de teneros. Muchas gracias.

Sobre todo, no podría haber llegado hasta aquí sin mi familia, mi gran todo. No es fácil poder estar al 100% cuando te encuentras a 782 km así que empiezo estas líneas con una disculpa por aguantarme durante toda mi vida, no solamente en esta etapa y por la falta de tiempo y las 'visitas de médico' realizadas. Si hay una palabra para describirlos es calidez. Esa calidez que recibes de un abrazo o de unas palabras. Gracias por estar incondicionalmente y por apoyarme en todo lo que me he propuesto. **Papá**, luchador nato por naturaleza, tu pequeña lo ha conseguido. Gracias por tu fuerza, amor y valentía que nos ha sacado adelante en tantos momentos. **Mamá**, *china chana, ¿no?* Siempre me dices que somos tu orgullo, Vosotros dos sois el mío. Gracias por todos los valores que me has dado que han contribuido a ser como soy. Gracias. **Tata**, me has hecho de madre cuando lo he necesitado. No tiendo a expresar mucho lo que pienso, ya lo sabes, espero hacerte llegar el orgullo que siento de ser tu hermana. Gracias por ser coraje, por defenderme cuando lo he necesitado, por abrirme los ojos y confiar cuando ni yo misma confiaba. Gracias por ser el cobijo al que ir siempre que lo he necesitado. A ti también **David**, gracias por llegar, eres la pieza que faltaba en esta familia.

Pablo, se juntaron 'la minita que estudia un doctorado y no sabe escribir y el minito que lo tiene todo, es guapo, inteligente, buena persona, divertido y paciente'. Nunca diría que tendría que agradecer a una red social que te cruzaras en mi camino. Creo que no voy a ser capaz de plasmar en unas pocas líneas todo lo que te mereces. Me dejas ser y crecer, has sabido creer y confiar en mi cuando no era capaz de hacerlo por mí misma. Has celebrado mis éxitos hasta cuando no los entendías y te has hecho un experto en temas que ni te interesaban solamente para apoyarme y hacerme sentir escuchada y querida. Eres como la lluvia tras la sequía y como un atardecer de verano en la playa. Eres mi mejor amigo, mi mejor persona y mi mejor todo. Gracias (*eres un crack, un maquinote, un fiera, vamos… un fuera de serie*).

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

LISTA DE ABREVIATURAS

^{11}C	Carbono 11
^{124}I	Iodo 124
^{13}N	Nitrógeno 13
^{15}O	Oxígeno 15
^{18}F	Flúor 18
^{18}F-FDG	18F-Fluoro-2-deoxi-2-d-glucosa
3R	Principio de las tres erres (Reducción, reemplazo y refinamiento)
^{68}Ga	Galio 68
^{89}Zr	Circonio 89
α	Alfa
ACN	Acetonitrilo
AF	Ácido Fórmico
APP	Molécula precursora de la proteína βA
A-scan	Medida axial
AS-OCT	OCT de segmento anterior
αSyn	α-sinucleína
α-valor	Valor de probabilidad
β	Beta
βA	Beta amiloide
BCA	Ácido bicinconínico
B-scan	Imagen tomográfica
BSS	*'Balance Salt Solution'* – solución salina balanceada
C	Control sano
CCG	Capa de células ganglionares
CEBEGA	Centro de Biomedicina Experimental de Galicia de la Universidad de Santiago de Compostela
CFE	Sector externo de la capa de los fotorreceptores
CFI	Sector interno de la capa de los fotorreceptores
Ci	Control intravítreo
CNE	Capa nuclear externa
CPE	Capa plexiforme externa
CPI	Capa plexiforme interna
CRNFL	Capa de las fibras nerviosas de la retina
cSLO	Escáner láser confocal
CT	Tomografía computarizada
DDA	Adquisición dependiente de datos

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

DEP	Proteínas expresadas diferencialmente
DIA	Adquisición independiente de datos
DMAE	Degeneración macular asociada a la edad
e^-	Electrón
e^+	Positrón
EA	Enfermedad de Alzheimer
EAU	Uveítis autoinmune experimental
EIU	Uveítis inducida por endotoxina
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas
EM	Esclerosis múltiple
EOS	Enfermedad de ojo seco
EP	Enfermedad de Parkinson
EPR	Epitelio pigmentario de la retina
ETDR	*'Early Treatment Diabetic Retinopathy Study'*-Diagrama clínico macular
FC	*'Fold Change'* – relación que indica la expresión génica en dos condiciones
FDG	Fluoro-2-deoxi-2-d-glucosa
FDG-C	Grupo control sano administrado con FDG
FGD-LPSi	Grupo EIU intravítreo administrado con FDG
FDG-LPSs	Grupo EIU sistémico administrado con FDG
FD-OCT	OCT de dominio de frecuencia
FDR	*'False Discovery Rage'* – tasa de descubrimiento falso
FOV	*'Field Of View'* – campo de vision
HCl	Ácido clorhídrico
I1	Sector inferior interno
I2	Sector inferior externo
IDIS	Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela
IHC	Tinción inmunohistoquímica
IN	Sector inferonasal
IR	Infrarrojo
iRT	Tiempo de retención interna
IT	Sector inferotemporal
KeV	Kilo-electrón voltio
LC-MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas
LPS	Lipopolisacárido
LPSi	Grupo EIU mediante inducción intravítrea
LPSs	Grupo EIU mediante inducción sistémica
MAPT	Proteína tau asociada a microtúbulos humanos
MBq	Mega-bequerelio

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Micro-LC-MS/MS	Microcromatografía liquida acoplado a masas en tandem-MS/MS
MS	Espectrometría de masas
N	Sector nasal
N1	Sector nasal interno
N2	Sector nasal externo
NaCl	Cloruro de sodio
NCAR	Grupo ratonas no portadoras del gen P301S
NO	Nervio óptico
OCT	Tomografía de coherencia óptica
PBS	*'Phosphate-buffered-saline'* – tampón fosfato salino
PET	Tomografía de emisión de positrones
PIO	Presión intraocular
PMU	Uveítis micobacteriana primaria
pRNFL	Zona peripapilar de la capa de fibras nerviosas de la retina
P301S	Grupo ratonas hemicigóticas para el gen humano P301S
p-tau	Tau fosforilada
RD	Retinopatía diabética
RM	Resonancia magnética
ROI	Región de interés
S1	Sector superior interno
S2	Sector superior externo
SD-OCT	OCT de dominio espectral
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida con SDS
SLD	Diodo superluminiscente
SN	Sector superotemporal
SNC	Sistema nervioso central
ST	Sector superotemporal
SUN	*'International Uveitis Study Group'*
SUV	Valor de absorción estandarizado
T	Sector temporal
T1	Sector temporal interno
$T_{1/2f}$	Tiempo de vida media
T2	Sector temporal externo
TD-OCT	OCT de dominio de tiempo
TLR2	Receptor tipo Toll 2
TLR4	Receptor tipo Toll 4
t-tau	Tau total
UE	Unión Europea
UVB	Ultravioleta

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ÍNDICE

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS III

LISTA DE ABREVIATURAS VIII

ÍNDICE XI

RESUMEN/RESUMO/SUMMARY 1

INTRODUCCIÓN 17

1. Anatomía ocular y comparativa entre especies 18
2. Modelos animales en el desarrollo de nuevos medicamentos en oftalmología 23
3. Modelos animales en el campo del segmento anterior 26
4. Modelos animales en el campo del segmento posterior 30
5. Herramientas para la caracterización de modelos animales en oftalmología 35
   - 5.1. Tomografía de coherencia óptica (OCT) 35
   - 5.2. Tomografía de emisión de positrones (PET) 42
   - 5.3. Proteómica 47

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS 51

1. Antecedentes 52
   - 1.1. Patologías de segmento anterior: uveítis 55
   - 1.2. Patologías de segmento posterior: enfermedad de Alzheimer (EA) 58
2. Objetivos 60

PLAN DE TRABAJO Y METODOLOGÍA 61

1. Plan de trabajo 62
2. Metodología 63

Caracterización preclínica de dos modelos animales de uveítis por inducción de endotoxina usando OCT, PET/CT y proteómica 63

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Caracterización preclínica de un modelo de tauopatía con técnicas de OCT 74

RESULTADOS 82

Caracterización preclínica de un modelo de uveítis por inducción de endotoxina usando OCT, PET/CT y proteómica 83
Caracterización preclínica de un modelo de tauopatía con técnicas de OCT 97

CONCLUSIONES 124

BIBLIOGRAFÍA 134

APÉNDICE 168

CONFLICTO DE INTERESES 169

ESTUDIOS PRECLÍNICOS 169

RESOLUCIÓN DE AUTORIZACIÓN DE PROYECTOS DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL 171

CERTIFICADO DE CAPACITACIÓN PARA LA REALIZACIÓN DE LOS PROYECTOS DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL 175

FINANCIACIÓN Y AGRADECIMIENTOS 181

ARTÍCULOS DERIVADOS DE LA PRESENTE TESIS DOCTORAL 181

AUTORÍA DE LAS FIGURAS 187

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS 188

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

RESUMEN/RESUMO/SUMMARY

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

RESUMEN

Debido a la prevalencia de las enfermedades oftálmicas y su importante impacto en la calidad de vida de los pacientes, la investigación y el desarrollo de nuevos fármacos para tratar enfermedades oftálmicas es un área clave de la biomedicina. En este contexto, los modelos preclínicos permiten la traslación de tratamientos e investigaciones al mismo tiempo que nos permiten comprender la etiología, patología y evolución de la enfermedad.

El segmento anterior permite una visión clara y sin obstáculos, ya que asegura el paso de la luz a la retina y un enfoque óptimo de la imagen. Las enfermedades que afectan a esta parte del ojo, como es el caso de la uveítis, suponen un importante desafío para la oftalmología debido a su alta prevalencia, la falta de consenso en su tratamiento debido a la heterogeneidad de su etiología y su devastador impacto en la calidad de vida de los pacientes.

El origen embriológico común de la retina y el cerebro proporciona una ventana directa al sistema nervioso central (SNC) a través del ojo, lo que permite el descubrimiento de nuevos biomarcadores *in vivo* para comprender y tratar enfermedades neurológicas. Las enfermedades neurodegenerativas tienen un gran inconveniente, la dificultad de detección precoz, el diagnóstico tardío y la falta de tratamiento eficaz frente a la cura de esta patología por lo que la retina, como la estructura más accesible del SNC puede proporcionar información valiosa sobre la progresión y patogénesis de las enfermedades neurodegenerativas, como es en el caso de la Enfermedad de Alzheimer (EA).

En este contexto, los modelos animales juegan un papel esencial en la investigación de estas enfermedades, facilitando el hallazgo de biomarcadores que permitan la comprensión de su patogénesis y el desarrollo de nuevos enfoques terapéuticos.

Los biomarcadores son herramientas clave en la medicina de precisión ya que permiten obtener guías de decisiones terapéuticas. Pueden clasificarse en moleculares, celulares o de imágenes. Dentro de los biomarcadores de imagen se encuentra la tomografía de coherencia óptica (OCT), una técnica de imagen no invasiva que permite obtener *in vivo* cortes estructurales micrométricos de las estructuras oculares. Otra técnica de imagen medica no invasiva que puede emplearse para buscar

biomarcadores de enfermedades en la tomografía de emisión de positrones (PET) en la cual se determina la función biológica de un tejido gracias a la energía que desprenden unas moléculas marcadas radiactivamente que se unen al tejido o célula diana. Finalmente, otra manera de detectar los cambios y los mecanismos biológicos y dianas farmacológicas es con el estudio del proteoma, también denominado proteómica, el cual da información sobre la funcionalidad de la célula, el tejido o un órgano.

En esta Tesis Doctoral se han desarrollado y caracterizado diferentes modelos animales de patologías con afectación oftálmica para la búsqueda de nuevos biomarcadores *in vivo* no invasivos que permitan ayudar en futuros estudios farmacológicos para dar respuesta a las necesidades clínicas actuales.

En la **primera parte**, para el campo de las patologías oculares de segmento anterior, se llevó a cabo una caracterización y comparación de dos modelos animales de uveítis inducida por endotoxina (EIU) mediante la administración de lipopolisacárido (LPS) de *Escherichia coli* con técnicas novedosas de imagen no invasivas. Para ello se analizaron y compararon los hallazgos encontrados en dos tiempos diferentes, antes y 24 horas tras la administración de LPS por dos vías diferentes. Para esta sección, 29 ratas macho Sprague Dawley de 6 semanas de vida y un peso aproximado de 262 gramos (g) fueron empleadas. Del total, 20 ratas fueron empleadas para el análisis de la presión intraocular (PIO) con el empleo de un tonómetro preclínico de rebote, la evaluación cualitativa de los signos inflamatorios oculares en cámara anterior con la ayuda de un OCT de segmento anterior (AS-OCT) y el análisis del proteoma mediante microcromatografía liquida en tándem de masas (micro-LC-MS/MS). Este primer grupo de animales evaluados se dividió homogéneamente en 4 grupos de 5 animales cada uno: animales sanos (C), animales a los cuales se les administró solución salina balanceada (BSS) de manera intravítrea vía pars plana (Ci), animales EIU inducidos de manera intravítrea vía pars plana (LPSi) y animales EIU inducidos de manera sistémica mediante la inyección subcutánea de LPS (LPSs). A las 9 ratas restantes se les realizó, además de un análisis de la inflamación ocular, un análisis de la inflamación presente en otros órganos del cuerpo, como la presente en hígado, bazo y rodilla, mediante un estudio PET y tomografía computarizada (PET/CT) con ^{18}F-Fluoro-2-deoxi-2-d-glucosa (^{18}F-FDG). Para ello, los animales fueron divididos en 3 grupos homogéneos: animales sanos (FDG-C); animales EIU inducidos de manera

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

intravítrea vía pars plana (FDG-LPSi); animales EIU inducidos de manera sistémica mediante la administración subcutánea en la pata de LPS (FDG-LPSs).

Tras el primer estudio de la PIO se observó que los animales LPSi mostraron una mayor PIO 24 horas después de la inducción en comparación con el grupo de animales sanos y con el grupo inducido sistémicamente. Tras este primer análisis, se analizaron los cambios dentro del mismo grupo y se observó que mientras que la PIO de los animales sanos y los del grupo Ci se mantuvo constante, el grupo LPSs tuvo una disminución en los valores y el grupo LPSi tuvo un aumento en la PIO 24 horas después de la inducción del modelo. En la evaluación de los signos inflamatorios oculares mediante AS-OCT. Los animales LPSi mostraron una mayor cantidad de infiltrado celular, membranas fibróticas e inflamación del iris. En el análisis de las proteínas moduladas en los grupos descritos, se detectaron más proteínas proinflamatorias en los modelos EIU, especialmente en el grupo LPSi, demostrando la presencia de histonas, proteínas cristalinas y la presencia de la proteína S100A8 y S100A9, proteína específica en diferentes modelos de uveítis. De entre los procesos biológicos más involucrados de las proteínas diferenciadas en el grupo LPSi, destacan la respuesta inmune humoral, la regulación positiva frente a la defensa de sustancias tóxicas, la respuesta inflamatoria y la respuesta a lípidos. Finalmente se caracterizó la inflamación subyacente en el globo ocular y se estableció la inflamación presente en el resto del cuerpo mediante un estudio ^{18}F-FDG-PET/CT, en el cual se describió una mayor captación ocular en los modelos inducidos en comparación con el grupo control. A su vez el grupo FDG-LPSi mostró una mayor captación ocular que la FDG-LPSs. Este comportamiento no fue el mismo en el análisis de la inflamación del resto de órganos, la cual mostró que la captación sistémica fue mayor en el grupo FDG-LPSs debido a que este tipo de inducción provoca una inflamación más generalizada. Mediante estos análisis se ha podido concluir que la inducción intravítrea conduce a una mayor inflamación ocular, que la OCT es valiosa para la evaluación del segmento anterior en modelos experimentales y que los estudios de ^{18}F-FDG-PET/CT resultan prometedores como biomarcadores de imagen no invasivos de enfermedades inflamatorias oculares.

En la **segunda parte** de la presente Tesis Doctoral, para el campo de las enfermedades con afectación en el segmento posterior del ojo, se caracterizaron mediante una técnica novedosa no invasiva de imagen, los cambios estructurales en las diferentes capas de la retina en un modelo murino de tauopatía. Para ello, el modelo empleado fue el denominado P301S, el cual es un modelo animal transgénico que expresa el gen

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

mutante P301S de la proteína tau asociada a microtúbulos humanos (MAPT) y desarrollan neuroinflamación glial y deterioro cognitivo a partir de los 3 meses. Para ello, un total de 9 ratonas fueron evaluadas, 6 ratonas hemicigóticas para el gen P301S (P301S) y 3 ratonas no portadoras del gen mutante (NCAR). Se realizó un análisis longitudinal de la PIO y del espesor de la retina total y de las capas retinianas a las 12, 24, 36 y 48 semanas de edad. Para la medida de la PIO, el instrumento empleado fue un tonómetro de rebote preclínico (iCare TonoLab) mientras que el análisis estructural de la retina se realizó con un OCT de dominio espectral (Spectralis® OCT). En la evaluación de la retina de los animales, se analizaron los hallazgos presentes en el fondo de ojo mediante la imagen infrarroja (IR) adquirida por el OCT-cSLO para posteriormente realizar una adquisición volumétrica y una adquisición personalizada circular centrada en el nervio óptico. Las capas retinianas fueron segmentadas por el propio software del instrumento y se analizaron un total de 8 capas retinianas: el espesor total de la retina, la capa de fibras nerviosas de la retina en la zona peripapilar (pRNFL), la capa de células ganglionares (CCG), la capa plexiforme interna (CPI), capa nuclear interna (CNI), capa plexiforme externa (CPE), capa nuclear externa (CNE) y epitelio pigmentario de la retina (EPR). Para el estudio del espesor de las diferentes capas retinianas se decidió analizar 8 sectores pertenecientes al círculo ETDR de 1, 2 y 3 mm de tamaño: superior interno (S1); superior externo (S2); inferior interno (I1); inferior externo (I2); nasal interno (N1); nasal externo (N2); temporal interno (T1); temporal externo (T2). Para el análisis de pRNFL, los sectores registrados fueron: superonasal (SN), nasal (N), inferonasal (IN), inferotemporal (IT), temporal (T) y superotemporal (ST).

Tras el análisis de todos los parámetros estudiados, se observó que no existían diferencias entre la presión intraocular medida entre el grupo P301S y el grupo NCAR a ningún tiempo analizado al igual que no se encontraron diferencias dentro de los grupos. Esto parece confirmar que el daño retiniano encontrado en el modelo P301S se basa en la neurodegeneración propia de la enfermedad. Evaluando los hallazgos encontrados en las imágenes de fondo de ojo se han encontrado unos puntos hiperreflectivos que puede observarse como puntos blancos localizados circundantes al nervio óptico en el 90% de los ojos del grupo P301S a las 48 semanas de vida mientras que los animales NCAR solo presentaban puntos hiperreflectivos en el 33% de los ojos analizados. Según la literatura, estos puntos podrían ser depósitos de p-tau presentes en las capas de la retina, pero son necesarios otros estudios de inmunohistoquímica o de fluorescencia para poder confirmar la naturaleza de estos puntos. Finalmente, en el

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

análisis del espesor de las capas retinianas, se ha observado una disminución del espesor de la pRNFL, espesor total de la retina, CPE, CNE y EPR de las retinas del grupo P301S en comparación con el grupo NCAR, debido a la neurodegeneración que probablemente ya está presente en los primeros tiempos de estudios. En la CNI, CPI y CCG se observa que el espesor de los animales P301S es mayor en todos los puntos y en todos los sectores en comparación con el grupo NCAR. Este suceso puede ser explicado en relación con la inflamación subyacente en el modelo causante de la activación y cambio de conformación de la microglía retiniana. En la comparación intragrupo del modelo P301S, se observa como de forma general existe un tiempo en el cual parece haber un aumento del espesor retiniano en las capas retinianas que no se mantiene en el tiempo ya que lo precede una disminución progresiva del espesor, disminución que puede correlacionarse con la neurodegeración del tejido y su posterior deterioro cognitivo. A partir de estos análisis se puede concluir que la retina puede constituir un buen biomarcador *in vivo* temprano para la evaluación de modelos de tauopatía y EA debido a que permite obtener imágenes longitudinales y analizar los cambios de forma fácil y no invasiva sin un impacto significativo en el bienestar de los animales. A su vez permitirá el estudio y desarrollo de nuevos fármacos que permitan ampliar el conocimiento sobre la enfermedad y sus terapias.

Por ello, el desarrollo de la presente Tesis Doctoral ha permitido la obtención de nuevos biomarcadores oculares en modelos animales de patologías oftálmicas y neurológicas con necesidades clínicas no resueltas, abriendo la puerta a nuevos estudios sobre otras enfermedades inflamatorias o sobre el seguimiento de la efectividad de potenciales tratamientos. Este trabajo ha puesto en manifiesto la necesidad de la multidisciplinariedad en la investigación biomédica y de precisión, herramientas clave para la traslación de conocimiento y el desarrollo de nuevos medicamentos en Salud.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

RESUMO

Debido á prevalencia de enfermidades oftálmicas e ao seu impacto significativo na calidade de vida dos pacientes, a investigación e o desenvolvemento de novos fármacos para tratar as enfermidades oftálmicas é unha área clave da biomedicina. Neste contexto, os modelos preclínicos permiten a tradución de tratamentos e investigacións ao tempo que nos permiten comprender a etioloxía, a patoloxía e a evolución da enfermidade.

O segmento anterior permite unha visión clara e sen obstáculos, xa que asegura o paso da luz á retina e o foco óptimo da imaxe. As enfermidades que afectan a esta parte do ollo, como a uveíte, representan un importante reto para a oftalmoloxía pola súa alta prevalencia, a falta de consenso sobre o seu tratamento pola heteroxeneidade da súa etioloxía e o seu impacto devastador na calidade de vida dos pacientes. .

A orixe embriolóxica común da retina e do cerebro proporciona unha xanela directa ao sistema nervioso central (SNC) a través do ollo, o que permite o descubrimento de novos biomarcadores in vivo para comprender e tratar enfermidades neurolóxicas. As enfermidades neurodexenerativas presentan un gran inconveniente, a dificultade da detección precoz, o diagnóstico tardío e a falta de tratamento eficaz para curar estas patoloxías, polo que a retina, como a estrutura máis accesible do SNC, pode proporcionar información valiosa sobre a progresión e patoxénese das enfermidades neurodexenerativas, como no caso da enfermidade de Alzheimer (EA).

Neste contexto, os modelos animais xogan un papel esencial na investigación destas enfermidades, facilitando o descubrimento de biomarcadores que permitan comprender a súa patoxénese e o desenvolvemento de novos enfoques terapéuticos.

Os biomarcadores son ferramentas fundamentais na medicina de precisión xa que permiten obter guías de decisión terapéutica. Pódense clasificar en moleculares, celulares ou de imaxe. Entre os biomarcadores de imaxe está a tomografía de coherencia óptica (OCT), unha técnica de imaxe non invasiva que permite obter seccións estruturais micrométricas de estruturas oculares in vivo. Outra técnica de imaxe médica non invasiva que se pode empregar para buscar biomarcadores de enfermidades na tomografía por emisión de positrones (PET) na que se determina a

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

función biolóxica dun tecido grazas á enerxía que desprenden as moléculas marcadas radioactivamente que se unen ao tecido tecido ou célula. Por último, outra forma de detectar cambios e mecanismos biolóxicos e dianas farmacolóxicas é co estudo do proteoma, tamén chamado proteómica, que proporciona información sobre a funcionalidade da célula, do tecido ou dun órgano.

Nesta Tese de Doutoramento desenvolvéronse e caracterizáronse diferentes modelos animais de patoloxías con afectación oftálmica co fin de buscar novos biomarcadores in vivo non invasivos que poidan axudar en futuros estudos farmacolóxicos a dar resposta ás necesidades clínicas actuais.

Na **primeira parte**, para o campo das patoloxías oculares do segmento anterior, realizouse unha caracterización e comparación de dous modelos animais de uveíte inducida por endotoxinas (EIU) mediante a administración de lipopolisacáridos (LPS) de Escherichia coli con técnicas de imaxe non invasivas . Para iso, analizáronse e compararonse os achados atopados en dous momentos diferentes, antes e 24 horas despois da administración de LPS por dúas vías diferentes. Para esta sección utilizáronse 29 ratas Sprague Dawley macho, de 6 semanas de idade e cun peso aproximado de 262 gramos (g). Do total, 20 ratas utilizáronse para a análise da presión intraocular (PIO) co uso dun tonómetro de rebote preclínico, a avaliación cualitativa dos signos inflamatorios oculares na cámara anterior coa axuda dun segmento anterior OCT (AS-OCT) e análise de proteomas mediante cromatografía líquida de masas en tándem (micro-LC-MS/MS). Este primeiro grupo de animais avaliados dividiuse de forma homoxénea en 4 grupos de 5 animais cada un: animais sans (C), animais aos que se lles administrou unha solución salina equilibrada (BSS) por vía intravítrea vía pars plana (Ci), animais inducidos por EIU por vía intravítrea vía pars plana (LPSi) e animais EIU inducidos sistémicamente por inxección subcutánea de LPS (LPS). Ademais dunha análise da inflamación ocular, as 9 ratas restantes foron sometidas a unha análise da inflamación presente noutros órganos do corpo, como a presente no fígado, bazo e xeonllo, mediante un estudo PET e tomografía computarizada (PET/TC).) con 18F-fluoro-2-desoxi-2-d-glicosa (18F-FDG). Para iso, os animais foron divididos en 3 grupos homoxéneos: animais sans (FDG-C); Animais EIU inducidos intravítreamente vía pars plana (FDG-LPSi); Animais EIU inducidos sistémicamente por administración subcutánea na pata de LPS (FDG-LPS). Despois do primeiro estudo de PIO, observouse que os animais LPSi mostraban unha PIO máis alta 24 horas despois da indución en comparación co grupo de animais sans e o grupo inducido

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

sistémicamente. Tras esta primeira análise, analizáronse os cambios dentro do mesmo grupo e observouse que mentres a PIO dos animais sans e dos do grupo Ci se mantivo constante, o grupo LPS presentou unha diminución dos valores e o grupo LPSi un aumento da PIO 24 horas despois da indución do modelo. Na avaliación dos signos inflamatorios oculares mediante AS-OCT. Os animais LPSi mostraron unha maior cantidade de infiltrado celular, membranas fibróticas e inflamación do iris. Na análise das proteínas moduladas nos grupos descritos, detectáronse máis proteínas proinflamatorias nos modelos EIU, especialmente no grupo LPSi, demostrando a presenza de histonas, proteínas cristalinas e a presenza da proteína S100A8 e S100A9, proteína específica en diferentes modelos de uveíte. Entre os procesos biolóxicos máis implicados nas proteínas diferenciadas no grupo LPSi destacan a resposta inmune humoral, a regulación positiva fronte á defensa de substancias tóxicas, a resposta inflamatoria e a resposta aos lípidos. Finalmente, caracterizouse a inflamación subxacente no globo ocular e estableceuse a inflamación presente no resto do corpo mediante un estudo 18F-FDG-PET/TC, no que se describiu unha maior captación ocular nos modelos inducidos en comparación co grupo control . Pola súa banda, o grupo FDG-LPSi mostrou unha maior captación ocular que os FDG-LPS. Este comportamento non foi o mesmo na análise da inflamación no resto de órganos, que demostrou que a captación sistémica foi maior no grupo de FDG-LPS porque este tipo de indución provoca unha inflamación máis xeneralizada. A través destas análises púidose concluír que a indución intravítrea conduce a unha maior inflamación ocular, que a OCT é valiosa para a avaliación do segmento anterior en modelos experimentais e que os estudos 18F-FDG-PET/TC son prometedores como biomarcadores de imaxe. tratamentos invasivos para enfermidades inflamatorias oculares.

Na **segunda parte** desta Tese Doutoral, para o ámbito das enfermidades que afectan o segmento posterior do ollo, caracterizáronse os cambios estruturais das distintas capas da retina nun modelo murino mediante unha nova técnica de imaxe non invasiva da tauopatía. Para iso, o modelo empregado foi o denominado P301S, que é un modelo animal transxénico que expresa o xene mutante P301S da proteína tau asociada a microtúbulos humanos (MAPT) e desenvolve neuroinflamación glial e deterioro cognitivo a partir dos 3 meses. Para iso, avaliáronse un total de 9 ratos, 6 ratos hemicigotos para o xene P301S (P301S) e 3 ratos non portadores do xene mutante (NCAR). Realizouse unha análise lonxitudinal da PIO e do grosor da retina total e das capas retinianas ás 12, 24, 36 e 48 semanas de idade. Para a medición de PIO, o instrumento utilizado foi un tonómetro de rebote preclínico (iCare TonoLab) mentres

USC DE COMPOSTELA

que a análise estrutural da retina realizouse cun OCT de dominio espectral (Spectralis® OCT). Na avaliación da retina dos animais analizáronse os achados presentes no fondo do ollo mediante a imaxe infravermella (IR) adquirida polo OCT-cSLO para realizar posteriormente unha adquisición volumétrica e unha adquisición circular personalizada centrada no nervio óptico. . Segmentáronse as capas retinianas mediante o propio software do instrumento e analizáronse un total de 8 capas retinianas: o grosor total da retina, a capa de fibras nerviosas retinianas na zona peripapilar (pRNFL), a capa de células ganglionares (GCC), a capa interna capa plexiforme (IPC), capa nuclear interna (INC), capa plexiforme externa (EPC), capa nuclear externa (ENP) e epitelio pigmentario da retina (RPE). Para estudar o grosor das diferentes capas retinianas, optouse por analizar 8 sectores pertencentes ao círculo ETDR de 1, 2 e 3 mm de tamaño: interior superior (S1); superior externo (S2); fondo interior (I1); inferior externo (I2); nasal interno (N1); nasal externo (N2); temporal interno (T1); temporal externo (T2). Para a análise pRNFL, os sectores rexistrados foron: superonasal (SN), nasal (N), inferonasal (IN), inferotemporal (IT), temporal (T) e superotemporal (ST).

Despois da análise de todos os parámetros estudados, observouse que non houbo diferenzas entre a presión intraocular medida entre o grupo P301S e o grupo NCAR en ningún momento analizado, do mesmo xeito que non se atoparon diferenzas dentro dos grupos. Isto parece confirmar que o dano da retina atopado no modelo P301S baséase na neurodexeneración inherente á enfermidade. Avaliando os achados atopados nas imaxes do fondo, atopáronse puntos hiperreflectantes que se poden observar como puntos brancos situados arredor do nervio óptico no 90% dos ollos do grupo P301S ás 48 semanas de idade mentres que os animais NCAR só tiñan hiperreflexión. manchas no 33% dos ollos analizados. Segundo a literatura, estas manchas poderían ser depósitos de p-tau presentes nas capas da retina, pero son necesarios outros estudos inmunohistoquímicos ou de fluorescencia para confirmar a natureza destas manchas. Finalmente, na análise do grosor das capas retinianas, observouse unha diminución do grosor do pRFNL, do grosor total da retina, CPE, CNE e RPE das retinas do grupo P301S en comparación co grupo NCAR, debido á neurodexeneración que probablemente xa está presente nas primeiras fases dos estudos. No CNI, CPI e CCG obsérvase que o grosor dos animais P301S é maior en todos os puntos e en todos os sectores en comparación co grupo NCAR. Este evento pódese explicar en relación á inflamación subxacente no modelo que causa a activación e o cambio de conformación da microglia da retina. Na comparación intragrupo do

USC DE COMPOSTELA

modelo P301S obsérvase que en xeral hai un tempo no que parece haber un aumento do grosor da retina nas capas retinianas que non se mantén no tempo xa que vai precedido dunha diminución progresiva do grosor. , unha diminución que pode estar correlacionada coa neurodexeración do tecido e o seu posterior deterioro cognitivo. Destas análises pódese concluír que a retina pode constituír un bo biomarcador precoz in vivo para a avaliación de modelos de tauopatía e DA porque permite obter imaxes lonxitudinais e analizar os cambios dun xeito sinxelo e non invasivo sen un impacto significativo na o benestar dos animais. Ao mesmo tempo, permitirá o estudo e desenvolvemento de novos fármacos que amplíen o coñecemento sobre a enfermidade e as súas terapias.

Por iso, o desenvolvemento desta Tese de Doutoramento permitiu a obtención de novos biomarcadores oculares en modelos animais de patoloxías oftálmicas e neurolóxicas con necesidades clínicas sen resolver, abrindo a porta a novos estudos sobre outras enfermidades inflamatorias ou sobre o seguimento da eficacia dos posibles tratamentos. Este traballo puxo de manifesto a necesidade da multidisciplinariedade na investigación biomédica e de precisión, ferramentas clave para a transferencia de coñecemento e o desenvolvemento de novos medicamentos en Sanidade.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

SUMMARY

Due to the prevalence of ophthalmic diseases and their significant impact on patients' quality of life, research and development of new drugs to treat ophthalmic diseases is a key area of biomedicine. In this context, preclinical models allow the translation of treatments and research while allowing us to understand the etiology, pathology and evolution of the disease. In this context, preclinical models allow the translation of treatments and research while allowing us to understand the etiology, pathology and evolution of the disease.

The anterior segment allows clear and unobstructed vision, as it ensures the passage of light to the retina and optimal focusing of the image. Diseases affecting this part of the eye, such as uveitis, pose a major challenge for ophthalmology due to their high prevalence, the lack of consensus in their treatment due to the heterogeneity of their etiology and their devastating impact on patients' quality of life.

The common embryological origin of the retina and brain provides a direct window to the Central Nervous System (CNS) through the eye, allowing the discovery of new *in vivo* biomarkers to understand and treat neurological diseases. Neurodegenerative diseases have a major drawback, the difficulty of early detection, late diagnosis and lack of effective treatment versus cure of these pathologies so the retina, as the most accessible structure of the CNS can provide valuable information on the progression and pathogenesis of neurodegenerative diseases, as in the case of Alzheimer's Disease (AD).

In this context, animal models play an essential role in the research of these diseases, facilitating the discovery of biomarkers that allow the understanding of their pathogenesis and the development of new therapeutic approaches.

Biomarkers are key tools in precision medicine as they provide guidelines for therapeutic decisions. They can be classified as molecular, cellular or imaging. Imaging biomarkers include Optical Coherence Tomography (OCT), a noninvasive imaging technique that allows micrometric structural slices of ocular structures to be obtained in vivo. Another non-invasive medical imaging technique that can be used to search for disease biomarkers is Positron Emission Tomography (PET), in which the

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

biological function of a tissue is determined by the energy released by radioactively labeled molecules that bind to the target tissue or cell. Finally, another way to detect changes and biological mechanisms and pharmacological targets is the study of the proteome, also called proteomics, which provides information about the functionality of the cell, tissue or organ.

In this Doctoral Thesis, different animal models of pathologies with ophthalmic involvement have been developed and characterized in order to search for new non-invasive in vivo biomarkers that may help in future pharmacological studies to meet current clinical needs.

In the **first part**, for the field of anterior segment ocular pathologies, a characterization and comparison of two animal models of Endotoxin-Induced Uveitis (EIU) by administration of *Escherichia coli* Lipopolysaccharide (LPS) was carried out with novel non-invasive imaging techniques. For this purpose, the findings found at two different times, before and 24 hours after LPS administration by two different routes, were analyzed and compared. For this section, 29 6-week-old male Sprague Dawley rats weighing approximately 262 grams (g) were used. Of the total, 20 rats were used for Intraocular Pressure (IOP) analysis using a preclinical rebound tonometer, qualitative assessment of ocular inflammatory signs in the anterior chamber using Anterior Segment OCT (AS-OCT) and proteome analysis using Liquid Microchromatography tandem Mass Spectrometry (micro-LC-MS/MS). This first group of animals evaluated was homogeneously divided into 4 groups of 5 animals each: healthy animals (C), animals to which Balanced Salt Solution (BSS) was administered intravitreally via *pars plana* (Ci), EUI animals induced intravitreally *via pars* plana (LPSi) and EIU animals induced systemically by subcutaneous injection of LPS (LPSs). The remaining 9 rats underwent, in addition to an analysis of ocular inflammation, an analysis of inflammation present in other organs of the body, such as that present in liver, spleen and knee, by means of a PET and Computed Tomography (PET/CT) study with ^{18}F-Fluoro-2-Deoxy-2-d-Glucose (^{18}F-FDG). For this purpose, the animals were divided into 3 homogeneous groups: healthy animals (FDG-C); EIU animals induced intravitreally via *pars plana* (FDG-LPSi); EIU animals induced systemically by subcutaneous administration in the paw of LPS (FDG-LPSs).

After the first IOP study, it was observed that LPSi animals showed higher IOP 24 hours after induction compared to the healthy animal group and the systemically induced group. After this first analysis, changes within the same group were analyzed

and it was observed that while the IOP of the healthy animals and those in the ci group remained constant, the LPSs group had a decrease in values and the LPSi group had an increase in IOP 24 hours after induction of the model. In the evaluation of ocular inflammatory signs by AS-OCT. LPSi animals showed a higher amount of cellular infiltrate, fibrotic membranes and iris inflammation. In the analysis of the modulated proteins in the described groups, more proinflammatory proteins were detected in the EIU models, especially in the LPSi group, showing the presence of histones, crystalline proteins and the presence of the S100A8 and S100A9 protein, specific protein in different models of uveitis. Among the most involved biological processes of the differentiated proteins in the LPSi group, the humoral immune response, the positive regulation against the defense of toxic substances, the inflammatory response and the response to lipids stand out. Finally, the underlying inflammation in the eyeball was characterized and the inflammation present in the rest of the body was established by an ^{18}F-FDG-PET/CT study, in which a higher ocular uptake was described in the induced models compared to the control group. In turn, the FDG-LPSi group showed a higher ocular uptake than the FDG-LPSs. This behavior was not the same in the analysis of the inflammation of the rest of the organs, which showed that the systemic uptake was higher in the FDG-LPSs group because this type of induction causes a more generalized inflammation. Through these analyses, it could be concluded that intravitreal induction leads to increased ocular inflammation, that oct is valuable for anterior segment assessment in experimental models, and that ^{18}F-FDG-PET/CT studies show promise as noninvasive imaging biomarkers of ocular inflammatory diseases.

In the **second part** of this Doctoral Thesis, for the field of diseases affecting the posterior segment of the eye, the structural changes in the different layers of the retina in a murine model of tauopathy were characterized by means of a novel non-invasive imaging technique. For this purpose, the model used was the so-called P301S, which is a transgenic animal model that expresses the P301S mutant gene of the human microtubule-associated tau protein (MAPTs) and develops glial neuroinflammation and cognitive impairment after 3 months of age. For this purpose, a total of 9 mice were evaluated, 6 mice hemizygous for the P301S gene (P301S) and 3 mice not carrying the mutant gene (NCAR). Longitudinal analysis of IOP and thickness of the total retina and retinal layers was performed at 12, 24, 36, and 48 weeks of age. For IOP measurement, the instrument used was a preclinical rebound tonometer (iCare TonoLab) while retinal structural analysis was performed with a spectral domain oct

USC DE COMPOSTELA

(Spectralis® oct). In the evaluation of the retina of the animals, the findings present in the fundus were analyzed using the infrared (IR) image acquired by the OCT-cSLO to subsequently perform a volumetric acquisition and a circular custom acquisition centered on the optic nerve. The retinal layers were segmented by the instrument's own software and a total of 8 retinal layers were analyzed: total retinal thickness, peripapillary Retinal Nerve Fiber Layer (pRNFL), Ganglion Cell Layer (GCL), Inner Plexiform Layer (IPL), Inner Nuclear Layer (INL), Outer Plexiform Layer (OPL), Outer Nuclear Layer (ONL) and Retinal Pigment Epithelium (RPE). For the study of the thickness of the different retinal layers, it was decided to analyze 8 sectors belonging to the ETDR circle of 1, 2 and 3 mm in size: inner superior (S1); outer superior (S2); inner inferior (I1); outer inferior (I2); inner nasal (N1); outer nasal (N2); inner temporal (T1); outer temporal (T2). For pRNFL analysis, the sectors recorded were: superonasal (SN), nasal (N), inferonasal (IN), inferotemporal (IT), temporal (T) and superotemporal (ST). After the analysis of all the parameters studied, it was observed that there were no differences between the intraocular pressure measured between the P301S group and the NCAR group at any time analyzed, and no differences were found within the groups. This seems to confirm that the retinal damage found in the P301S model is based on the neurodegeneration inherent to the disease. Evaluating the findings found in the fundus images, hyperreflective dots that can be observed as localized white dots surrounding the optic nerve were found in 90% of the eyes of the P301S group at 48 weeks of life, while the NCAR animals only presented hyperreflective dots in 33% of the eyes analyzed. According to the literature, these spots could be deposits of p-tau present in the retinal layers, but further immunohistochemical or fluorescence studies are necessary to confirm the nature of these spots. Finally, in the analysis of the thickness of the retinal layers, a decrease in the thickness of the pRNFL, total retinal thickness, OPL, ONL and RPE of the retinas of the P301S group was observed compared to the NCAR group, due to neurodegeneration that is probably already present at early study times. In the INL, IPL and GCL, it is observed that the thickness of the P301S animals is greater at all points and in all sectors compared to the NCAR group. This event can be explained in relation to the underlying inflammation in the model causing the activation and conformational change of retinal microglia. In the intragroup comparison of the P301S model, it is observed that in general there is a time in which there appears to be an increase in retinal thickness in the retinal layers that is not maintained over time since it is preceded by a progressive decrease in thickness, a decrease that can be correlated with the neurodegeneration of the tissue and its subsequent cognitive deterioration. From these analyses it can be concluded that the

retina may constitute a good early in vivo biomarker for the evaluation of tauopathy and ad models because it allows obtaining longitudinal images and analyzing changes easily and noninvasively without a significant impact on animal welfare. At the same time, it will allow the study and development of new drugs that will broaden the knowledge about the disease and its therapies.

Therefore, the development of this doctoral thesis has allowed obtaining new ocular biomarkers in animal models of ophthalmic and neurological pathologies with unresolved clinical needs, opening the door to new studies on other inflammatory diseases or on the monitoring of the effectiveness of potential treatments. This work has highlighted the need for multidisciplinary in biomedical and precision research, key tools for the transfer of knowledge and the development of new drugs in health.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

INTRODUCCIÓN

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

INTRODUCCIÓN

1. Anatomía ocular y comparativa entre especies

Las enfermedades oculares afectan la calidad de vida de cientos de millones de personas en todo el mundo. La ceguera y la discapacidad visual tienen consecuencias importantes y duraderas en todos los aspectos de la vida, incluidas las actividades personales diarias, la interacción con la comunidad, las oportunidades escolares y laborales y la capacidad de acceder a los servicios públicos.

El ojo es un órgano único debido a su compleja anatomía, fisiología y bioquímica porque comprende estructuras muy diferentes con funciones fisiológicas específicas naturaleza compleja del ojo. El globo ocular humano puede dividirse en dos segmentos, el segmento anterior que conforma desde la córnea hasta la cara anterior el cristalino y el segmento posterior donde se encuentra la cámara vítrea y la retina con la mácula, fóvea y el nervio óptico (Figura 1).

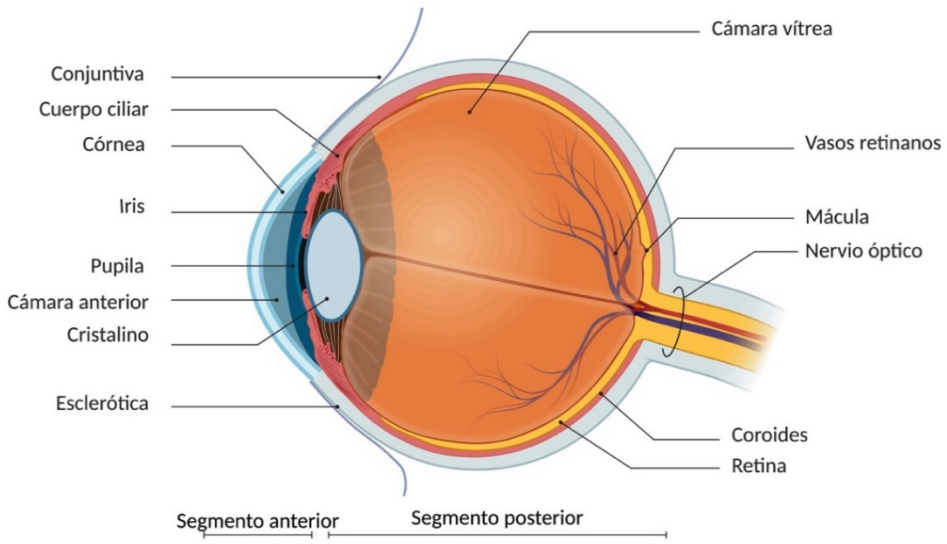


Figura 1. Resumen gráfico de la anatomía humana ocular y las estructuras que la componen, así como la división entre los segmentos oculares. Creado con BioRender.com.

Por otra parte, el globo ocular humano consta de 3 capas divididas en las siguientes subdivisiones (1):

- Consta de una córnea transparente, una esclerótica opaca y un limbo que permite la interdigitación de estas. Estas estructuras proporcionan soporte al ojo a la vez que permiten el paso de la luz hacia el resto de las estructuras oculares.
- La siguiente estructura o capa se denomina capa uveal. Está formada por la úvea que a su vez la conforma el iris, cuerpo ciliar y coroides. Es la capa vascular central del globo ocular.
- Finalmente, la capa interior del ojo se denomina a su vez retina y es la capa de tejido sensible a la luz que permite convertir el impulso lumínico en señal eléctrica para posteriormente transducirlas en imágenes. La retina consta a su vez de 10 capas detalladas en la Figura 2.

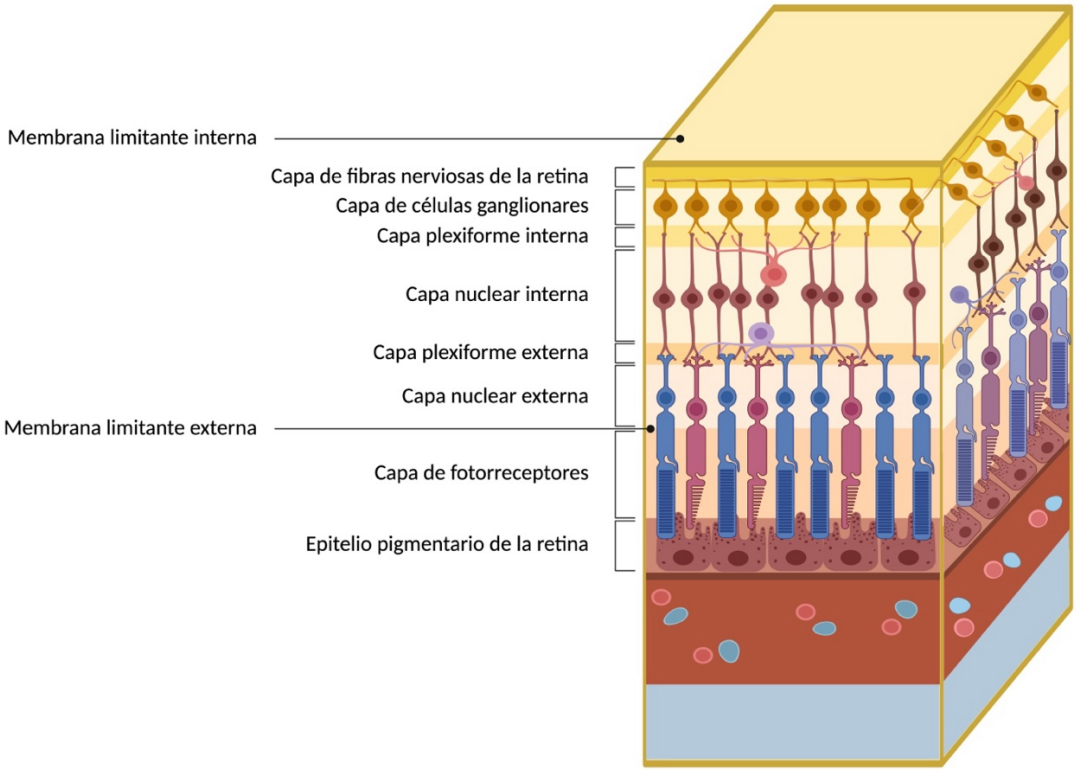


Figura 2. Esquema de las diferentes capas de la retina neurosensorial. La capa más externa (epitelio pigmentario de la retina) está en contacto con la coroides mientras que la capa más interna (membrana limitante interna) se encuentra en contacto directo con la cavidad vítrea. Creado con BioRender.com.

Una visión buena por tanto se producirá cuando exista una buena funcionalidad de todas las estructuras y tejidos que conforma el globo ocular. Es por ello por lo que la salud de este órgano es tan importante para el correcto funcionamiento del mismo y precisa de estudios e investigación que permitan conocer sus patologías para garantizar el manejo y el desarrollo de terapias óptimas.

Aunque cada especie tienen una anatomía específica y unas características oculares únicas, los roedores mantienen similitudes que permiten ser usados como buenos modelos animales de patologías oftálmicas. La primera diferencia y más notable es en relación al tamaño del globo ocular y de sus estructuras en particular, un ejemplo directo es el tamaño axial del ojo ya que mientras que el globo ocular tiene un tamaño de longitud axial de 24 mm, los roedores pueden tener longitudes axiales entre 3,4 y 6 mm dependiendo de si es un ratón o una rata respectivamente (2,3) (Figura 3).

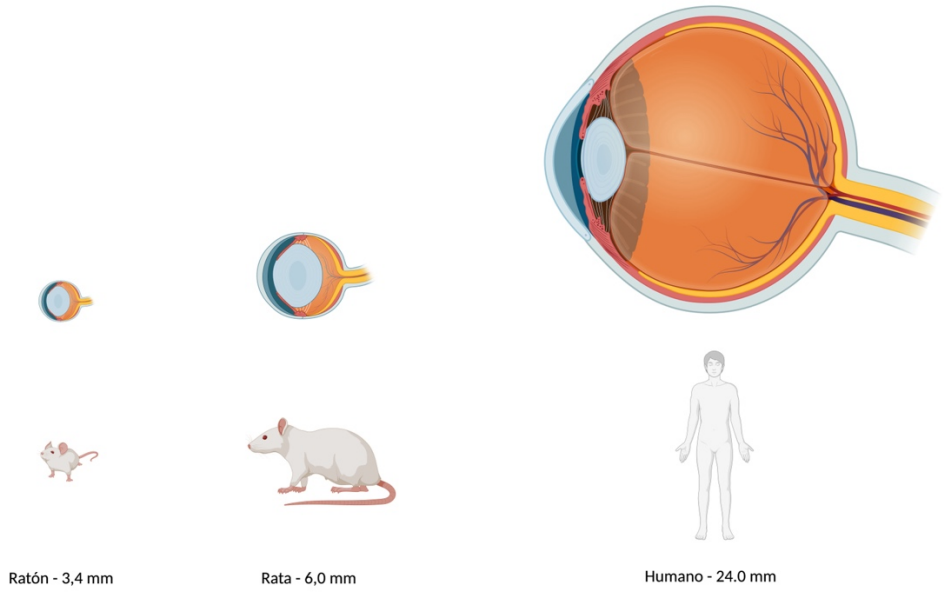


Figura 3. Comparativa de tamaño y anatomía del globo ocular de un humano frente a los dos grupos de roedores que más se emplean en investigación preclínica como es el ratón y la rata. Creado con BioRender.com.

Otra de las diferencias que se puede observar entre roedores y humanos es la forma de la córnea, la córnea humana tiene una forma ovalada (4) mientras que los roedores tienen una forma más plana o circular (3,5). Esta diferencia no interfiere en las capas que conforman las córneas de ambas especies debido a que ambas están tienen epitelio,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

membrana de Bowman, estroma, membrana de Descemet y endotelio. Otra de las diferencias entre especies es la forma y el espacio que ocupa el cristalino dentro del ojo. En los humanos, el cristalino es una lente biconvexa que ocupa un espacio pequeño dentro del globo ocular. No es así en el caso de los roedores, los cuales tienen una estructura esferoidal que ocupa casi el 70% del espacio intraocular (3). A nivel funcional, el cristalino de un roedor no es capaz de modificar su estructura ni de contraer el músculo ciliar con la misma fuerza con la que lo haría un humano disminuyendo así su capacidad de enfoque de la imagen.

Con respecto a las diferencias existentes en la retina neurosensorial, la proporción y los tipos de células fotorreceptoras son menores en el caso de los roedores. Existen dos tipos de fotorreceptores, los conos encargados de la visión del color y los bastones encargados de la visión nocturna. En la retina existen diferentes tipos de conos dependiendo de qué tipo de opsina se encuentre en sus segmentos y a que longitud de onda sean sensibles. Con esta explicación, en los humanos se observan tres tipos de conos diferentes: conos L (sensibles a longitudes de onda largas equivalentes a luces rojas), M (sensibles a longitudes de onda medias equivalentes a la luz verde) y S (sensibles a longitudes de onda cortas equivalentes a la luz azul). En el caso de los roedores tales como ratón y rata, solo se han observado conos sensibles a longitudes medias (luz verde) y cortas (ultravioleta) (1). En relación con los bastones, la proporción de bastones es mayor en las especies murinas. Cabe destacar que el desarrollo de este tipo celular se regula con una molécula denominada dihidroxifenilalanina. Esta molécula se desarrolla siempre y cuando el animal no sea albino por lo que es algo a tener en cuenta si se quiere estudiar modelos con ratas albinas puesto que tendrán bastones poco desarrollados (6).

Siguiendo por las similitudes y diferencias en la retina entre humanos y roedores, como ocurre en los humanos, la retina del roedor proviene de la misma estructura embrionaria, el neuroectodermo. Esto hace que al describir la retina neurosensorial nos encontremos las mismas capas en ambas especies, nombrándolas de la más exterior a la más interior: epitelio pigmentario de la retina (EPR), capa de los fotorreceptores, membrana limitante externa, capa nuclear externa (CNE), capa plexiforme externa (CPE), capa nuclear interna (CNI), capa plexiforme interna (CPI), capa de células ganglionares (CCG), capa de fibras nerviosas de la retina (CFNR) y membrana limitante interna. En cuanto a qué tipo de células se encuentran en la retina neurosensorial del roedor encontramos también semejanzas con los humanos.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Encontramos células de Müller, astrocitos y microglía y al igual que ocurre en los humanos, estas células son importantes para el correcto funcionamiento de la retina ya que proporcionan que exista una buena sinapsis, favorece el transporte de nutrientes y proporciona protección frente a agentes externos (7).

Finalmente, destacar que los roedores no tienen fóvea (8,9). Esta característica probablemente sea la mayor limitante para el desarrollo de modelos de enfermedades oculares que cursen con daño foveal ya que no va a poder desarrollarse la patología en su conjunto.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2. Modelos animales en el desarrollo de nuevos medicamentos en oftalmología

La investigación y el desarrollo de nuevos medicamentos para tratar patologías oftálmicas son áreas críticas en la biomedicina, debido a la prevalencia y el impacto significativo de estas enfermedades en la calidad de vida de los pacientes. El ojo es un órgano complejo que permite obtener información de señales visuales gracias a la transducción de esos impulsos al cerebro (10). Por ello, las patologías oftálmicas pueden llegar a producir un cambio grave en la vida de los pacientes que las sufren, comprometiendo su visión hasta el punto de que pueden llegar a producir ceguera (11,12).

Dentro de este contexto, los modelos preclínicos permiten la traslación de terapias y de estudios a la vez que nos permiten comprender la etiología, patología y evolución de las enfermedades (13). Con ello se facilita el desarrollo de nuevos fármacos y el descubrimiento de nuevos biomarcadores indicadores del estado de la patología y su evolución con tratamiento. Estos modelos permiten la replicación de características claves de las patologías humanas, esenciales para estudiar los mecanismos subyacentes de la enfermedad y evaluar la eficacia y seguridad de nuevos tratamientos en un entorno biológicamente relevante.

Destacar que la experimentación animal se encuentra regulada para asegurar el bienestar y el buen uso de los animales en investigación, esta regulación, recogida por el Real Decreto (RD) 118/2021, de 23 de febrero, por el que se modifica el RD 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia (14), dicta los principios diseñados en investigación preclínica comúnmente conocidos como los principios de las tres erres, presentes en todos los modelos animales empleados en la actualidad (15):

- Reemplazo: intentar lo máximo posible sustituir los modelos *in vivo* por modelos *in vitro* que proporcionen los mismos resultados.
- Reducción: disminución del número de animales empleados. Para ello es necesario un diseño experimental óptimo y refinado para disminuir la variabilidad de los resultados y evitar procedimientos innecesarios. Refinamiento: regido por la premisa de bienestar animal y mejora de la calidad

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

de los resultados. Un animal en buenas condiciones, con las necesidades fisiológicas y comportamentales cubiertas y con adecuados procedimientos de anestesia y analgesia proporciona unos resultados fiables, sólidos y cumple con el acuerdo de bienestar animal.

Teniendo en cuenta los principios de las tres erres, podría decirse que un buen modelo animal debería ser aquel que nos permita estudiar de manera fidedigna la patología humana sin descuidar las condiciones del animal y del investigador.

Dentro de los modelos animales se podrían dividir en dos grandes grupos: los modelos animales inducidos y los modelos animales modificados genéticamente.

Un modelo animal inducido es aquel del cual partimos de un animal sano y se le realiza algún procedimiento para producir la patología. Son modelos que inicialmente se pueden considerar más rápidos ya que se controla desde el momento de la inducción la progresión de la patología. La inducción de patologías oftálmicas en modelos animales se puede realizar mediante una manipulación mecánica como es el caso del modelo de enfermedad de ojo seco mediante escisión de glándula lagrimal (16), administración de sustancias biológicas o fármacos como es el caso del modelo de uveítis por administración de endotoxina (17), manipulación de la dieta como es el caso de la retinopatía diabética mediante la administración de una dieta alta en azucares (18) o cambios ambientales para favorecer la desecación de la superficie ocular y provocar una queratoconjuntivitis (19).

Por otra parte, en los modelos animales modificados genéticamente se necesita modificar o eliminar determinadas secuencias de ADN con el fin de conseguir unas características o rasgos específicos. Gracias a estos cambios se puede llegar a conseguir que los cambios en el genoma del animal pasen generaciones y así crear cepas de modelos específicos estables de patologías humanas. Dentro de los modelos animales modificados genéticamente, existen cepas que replican el síndrome de Sjögren como es el ratón *MRL/lpr* (20) o el modelo de presión intraocular alta para el estudio del glaucoma en ratones *DBA/2J (21).* Otros modelos animales que cada vez más están ganando fama en el ámbito de la oftalmología son los modelos genéticos de neurodegeneración (12).

Gracias a los diversos modelos murinos se han podido identificar nuevos enfoques terapéuticos dirigidos a garantizar la seguridad y eficacia de nuevos tratamientos (22–

25), la neuroprotección (26–28), reducción de presión intraocular (29) o la disminución de signos clínicos claves en la progresión de enfermedades. En este contexto, los modelos animales en oftalmología han emergido como herramientas fundamentales para la investigación de las patologías y el desarrollo de nuevas terapias por su capacidad de replicar aspectos claves de las enfermedades humanas. A su vez permiten evaluar nuevas terapias, más innovadoras y efectivas que provoquen un avance en la medicina oftálmica.

A pesar de las ventajas significativas que ofrecen los modelos animales, es importante reconocer las limitaciones inherentes a su uso. La extrapolación de resultados de animales a humanos no siempre es directa debido a las diferencias fisiológicas y genéticas entre especies (30). No obstante, el desarrollo continuo y la mejora de estos modelos, así como la combinación con enfoques de investigación avanzada como la biología de sistemas y las tecnologías de edición genética, prometen mejorar su relevancia y aplicabilidad en la investigación oftálmica.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3. Modelos animales en el campo del segmento anterior

Los modelos animales deben poder reproducir el proceso patológico a estudiar que nos permita establecer, comprender y permitir el desarrollo traslacional de terapias o de diagnóstico. Para ello es necesario replicar los fenotipos importantes para el avance del conocimiento, pudiéndose no replicar la enfermedad completa humana (30).

El segmento anterior del ojo, que incluye la córnea, conjuntiva, el iris, el cuerpo ciliar, el cristalino y las vías de salida del humor acuoso (31), es una región crucial para el mantenimiento de la visión clara sin obstáculos ya que garantiza el paso de la luz a la retina y permite el enfoque óptimo de la imagen. Las patologías que afectan esta parte del ojo, como el ojo seco, las cataratas, el queratocono y las enfermedades inflamatorias como la uveítis, representan un desafío significativo para la oftalmología debido a su alta prevalencia y el impacto devastador que pueden tener en la calidad de vida de los pacientes (12,32). En este contexto, los modelos animales juegan un papel esencial en la investigación de estas enfermedades, facilitando la comprensión de su patogénesis y el desarrollo de nuevos enfoques terapéuticos.

Los modelos animales de patologías del segmento anterior del ojo proporcionan un marco fundamental para el estudio de los mecanismos subyacentes de estas enfermedades. A continuación, se describirán algunos de los modelos animales más empleados para el estudio de las patologías de segmento anterior más prevalentes.

Glaucoma

El glaucoma se puede definir como un conjunto de neuropatías ópticas signo en común es el daño en la cabeza del nervio óptico. Es una de las causas de ceguera irreversible más prevalentes en el mundo (33) . Dentro de los factores de riesgo que favorecen a la enfermedad, una presión intraocular (PIO) elevada aumenta en gran medida la posibilidad de daño axonal y de glaucoma, pero no es una causa intrínseca de la enfermedad. Los modelos murinos de glaucoma se pueden diferenciar entre dependientes de la PIO o independientes. Dentro de los modelos de glaucoma de segmento anterior, los más empleados son los dependientes de la PIO. En estos se busca observar un daño axonal produciendo un aumento en la presión intraocular. En este sentido, la adición de microesferas o agentes viscosos en las vías del humor acuoso provocan un aumento agudo de la PIO y un daño en la CCG (34,35). Estos modelos

son relativamente sencillos de realizar y producen buenos resultados debido a que se induce el aumento de PIO por acúmulo de humores tras la obstrucción de las vías de salida, pero en muchos casos precisan de múltiples inyecciones, aumentando los procedimientos en el animal. Los modelos murinos de glaucoma que imitan la elevación de la presión intraocular y la consecuente degeneración del nervio óptico han sido útiles para identificar nuevos objetivos terapéuticos y evaluar la eficacia de fármacos neuroprotectores y agentes reductores de la presión intraocular.

Cataratas

La catarata es una enfermedad que cursa con opacificación progresiva del cristalino. Si no se trata puede provocar pérdida de visión y ceguera. Son tres los tipos de cataratas en los que se pueden clasificar dependiendo de la zona y estructuras del cristalino que estén afectadas. Las cataratas se pueden dividir en cataratas nucleares, subcapsulares y corticales. Los diferentes modelos animales fenotipan un tipo de catarata específica y permiten el estudio de la formación y evolución de la enfermedad. En este caso existen dos maneras de obtener un modelo animal de cataras, mediante la inducción de la enfermedad y por modelos genéticos.

Dentro de los modelos inducidos, lo más común es administrar al animal alguna sustancia como el selenito de sodio o glucocorticoesteroides (36). La administración de selenito de sodio induce la formación de cataratas nucleares (37). Los estudios con este modelo animal han permitido caracterizar la dureza y elasticidad del cristalino (38) y evaluar potenciales fármacos (39–42). Otro de los modelos más empleados para el estudio de las cataras es exponer al ojo a la luz ultravioleta o a la radiación ionizante, debido a que se conoce los efectos que producen estas longitudes de onda para generar especies reactivas de oxígeno y posteriormente cataratas capsulares (43). Gracias a estos estudios se ha obtenido información acerca de cómo las células epiteliales del cristalino pueden repararse tras un daño inducido por luz ultravioleta (UVB) (44). Otro ejemplo de aplicabilidad de estos modelos animales es como se han descubierto genes importantes en el daño oxidativo causado por la radiación UVB, como es el gen Grx2 (45). Del mismo modo, los modelos de cataratas inducidas por diversos agentes químicos o genéticos han permitido el desarrollo y la evaluación de terapias quirúrgicas y farmacológicas innovadoras.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Enfermedad de ojo seco (EOS)

La enfermedad de ojo seco se denomina como 'una enfermedad multifactorial de la superficie ocular caracterizada por una pérdida de homeostasis de la película lagrimal, y acompañada de síntomas oculares, en los que la inestabilidad de la película lagrimal y la hiperosmolaridad, la inflamación y el daño de la superficie ocular y las anomalías neurosensoriales juegan un papel etiológico' (46). Dentro de los modelos murinos se encuentra el modelo de resección de la glándula lagrimal. Los roedores tienen dos glándulas lagrimales principales encargadas de secretar la lagrima acuosa (glándula lagrimal extraorbitaria e infraorbitaria). A su vez presentan una glándula de Harder que secreta lípidos y porfirinas. La escisión de las glándulas lagrimales o de la glándula de Harder provoca una disminución directa del volumen lagrimal y por tanto provoca ojo seco por deficiencia acuosa (16). Del mismo modo, se puede conseguir inducir daño en la superficie ocular y generar inestabilidad lagrimal administrando cloruro de sodio (NaCl) al 10% en la superficie ocular u otros fármacos como puede ser la escopolamina o el bromhidrato de escopolamina, atropina, toxina botulínica (47–50).

A los modelos anteriores se les puede sumar el estrés ambiental que puede aumentar los signos de ojo seco del resto de modelos a la vez que puede emplearse como modelo robusto de enfermedad de ojo seco. Para ello se utiliza una combinación de baja humedad, temperatura ambiente y flujo de aire constante para desarrollar síntomas de ojo seco más acusados (49,51).

Con el desarrollo de estos modelos se han podido investigar nuevos biomarcadores de la enfermedad y nuevas vías de tratamiento como es la función de la IL-20 en la EOS y nuevas terapias para la enfermedad (22,52,53)

Uveítis

Se denomina uveítis a la inflamación de la úvea. El desarrollo de los diferentes modelos animales de la enfermedad ha permitido estudiar las vías implicadas en el desarrollo de la patología y las diferentes estructuras involucradas pudiendo simular los distintos tipos de uveítis humana que se conocen. Uno de los modelos de uveítis más caracterizado es el modelo de uveítis autoinmune experimental (por sus siglas en inglés, EAU). En este se generan signos similares a una uveítis endógena humana mediante la inmunización con antígenos retinianos cuyos signos son la oftalmia simpática, la enfermedad de Behçet y la retinocoroidopatía entre otros (54). Los

procedimientos más empleados son la administración de la proteína de unión al retinol (RBP-3), la inyección subcutánea de antígeno de suero bovino, la inmunización con arrestina en ratones transgénicos HLA y la administración de rodopsina entre otros (55–57). También se pueden generar modelos de animales de uveítis con la administración de proteínas no retinianas como la melanina o tirosinasa. Con estos modelos se consigue una inflamación ocular en iris, cuerpo ciliar y coroides que es óptima en el manejo de la uveítis anterior (58). Otro modelo para analizar los signos de una uveítis sin afectación retiniana es la uveítis micobacteriana primaria (por sus siglas en inglés, PMU). La respuesta del organismo a este modelo a diferencia del EAU reside en la respuesta del sistema inmunitario innato y adaptativo a la administración subcutánea de una micobacteria (59,60).

Por último, el modelo más empleado en los últimos años para estudiar la fisiopatología de las uveítis anteriores es el modelo de uveítis por inducción de endotoxina (EIU) (61). El desencadenante es la inflamación basada en la reacción que provoca el sistema inmune innato del animal tras la administración de lipopolisacárido (LPS) de endotoxinas bacterianas (62). Este modelo se detallará en profundidad en la primera parte de la presente tesis doctoral.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4. Modelos animales en el campo del segmento posterior

El segmento posterior del globo ocular engloba a los dos tercios posteriores del ojo e incluye la cámara vítrea con el humor vítreo, la retina, la coroides y el nervio óptico. Su salud y buen funcionamiento es fundamental para la visión por lo que las patologías que afectan esta región pueden llevar a la pérdida de visión irreversible y una discapacidad severa si no te tratan adecuadamente. Entre las enfermedades más prevalentes del segmento posterior se encuentran la retinopatía diabética, la degeneración macular relacionada con la edad (DMAE) y las neuropatías ópticas, todas las cuales representan desafíos significativos para la salud pública a nivel mundial. La investigación en estos campos se ha beneficiado enormemente del uso de modelos animales, que han demostrado ser herramientas cruciales para entender la patogénesis de estas enfermedades y para el desarrollo y evaluación de nuevas terapias.

A continuación, se describirán los avances y el desarrollo en los modelos animales para el estudio de las patologías de segmento posterior más prevalentes en la actualidad.

Retinopatía diabética

La retinopatía diabética es una de las causas de pérdida de visión y ceguera en la población de edad laboral. Es una patología que daña los vasos sanguíneos de la retina y que está relacionada directamente con la diabetes mellitus (63). La investigación preclínica en ratas y ratones han permitido avanzar en la comprensión de la patogénesis de la enfermedad, su etiología y en el desarrollo de tratamientos que abordan la inflamación y la angiogénesis patológica (64). Dentro de esta enfermedad, su inducción se puede realizar mediante la inducción de hiperglucemias o con la generación de diabetes en el animal con la extirpación quirúrgica del páncreas (65).

Existen diferentes modelos en los que se utiliza tanto la administración de dietas altas en galactosa para producir el desencadenante de la diabetes en el animal (18) como la administración de fármacos como es la estreptozotocina, fármaco con el cual se ha demostrado que provoca un daño y adelgazamiento de las capas retinianas, neovascularización y capilares acelulares (66). Otros modelos animales más mecánicos incluirían el daño ocular con láser o cirugía (67).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Degeneración Macular Asociada a la Edad (DMAE)

La DMAE es una enfermedad degenerativa de la macula cuyo trastorno destruye lentamente la visión central. Tiene diversos factores de riesgo entre los cuales se incluyen la edad avanzada, el tabaquismo y la hipertensión. Tiene tres etapas dependiendo de cómo se presenta la enfermedad, etapa temprana, intermedia y tardía. La etapa tardía de la DMAE a su vez puede presentarse de dos formas, DMAE neovascular y atrófica. La DMAE neovascular se presenta con neovasos coroideos permeables, edema o hemorragia retiniana mientras que la DMAE atrófica o seca se presenta con atrofia geográfica (68). Aunque existen diferencias anatómicas entre los humanos y los roedores en relación a la mácula, los modelos murinos de DMAE replican la formación de drusas y la degeneración de la retina, permitiendo el estudio de los mecanismos moleculares subyacentes a la enfermedad (69,70). A su vez, han permitido el desarrollo de terapias antiangiogénicas como los inhibidores del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (71,72).

El origen embriológico común de la retina y el cerebro proporciona una ventana directa del sistema nervioso central a través del ojo facilitando el descubrimiento de nuevos biomarcadores in vivo con los que conocer y tratar las enfermedades neurológicas (73). Los trastornos neurodegenerativos tienen un gran inconveniente, la dificultad de su detección temprana y el retraso en el diagnóstico (74) es por ello que la retina, al formar parte del sistema nervioso central (SNC) y ser la estructura más accesible del SNC, puede proporcionar información valiosa acerca de la progresión y patogenia de las enfermedades neurodegenerativas (75). A continuación, se detallan tres importantes enfermedades neurodegenerativas en donde la investigación con modelos animales cobra especial relevancia.

Esclerosis múltiple (EM)

La EM es un trastorno autoinmune neurodegenerativo que provoca la desmielinización de los axones de las neuronas del sistema nervioso (76). Cursa con diversos signos clínicos que afectan a las vías motoras, sensoriales, autónomas y visuales. Dentro del daño visual asociada a la EM, se encuentra la neuritis óptica, una inflamación del nervio óptico que provoca pérdida visual y discromatopsia.

Los pacientes con EM con neuritis óptica a menudo no recuperan la visión tras disminuir la inflamación del nervio óptico debido al efecto desmielinizante de la

USC DE COMPOSTELA

enfermedad y a la pérdida axonal, por lo que el estudio de las diferentes formas de neuritis óptica junto con el hallazgo de biomarcadores tempranos de la enfermedad pueden ayudar al diagnóstico y seguimiento, favoreciendo la recuperación y evitando en gran medida una pérdida irreversible de visión (77).

En este sentido, uno de los modelos animales más extendidos desarrollado es el de encefalomielitis autoinmune experimental (EAE) de EM. Gracias a estos modelos animales se han podido hallar biomarcadores presentes en los nervios ópticos de los animales como puede ser la capaína (78) y se ha descrito la activación de la microglía, se ha observado una disminución de la 2,'3'-nucleótido cíclico 3'-fosfohidrolasa, un marcador de la síntesis de mielina (79) entre otros. A su vez se ha descrito mediante tomografía de coherencia óptica (OCT) la inflamación de la retina tras la inducción del modelo en ratones seguida de una degeneración neuroaxonal, señalando la patología retiniana con la que cursan los pacientes con EM (80). Con el avance en investigación en los modelos animales de EM se han desarrollado potenciales terapias frente a esta enfermedad como es el tratamiento con anti-TNFR1 y anti-TFNFR2, el cual ha demostrado eficacia frente a la respuesta inmunitaria (81,82); la participación de la espermina oxidasa (SMOX) en esta enfermedad neurodegenerativa y su potencial tratamiento con N1, N4-bis (2,3-butadienil)-1,4-butano diamina (MDL) como neuroprotector en la inflamación y daño visual (83); o la acción protectora antiinflamatoria de los ácidos grasos en la dieta frente a los eventos inflamatorios y muerte de células ganglionares asociados a la neuritis óptica (84).

Enfermedad de Parkinson (EP)

Dentro de las enfermedades neurodegenerativas, la EP es característica por producir rigidez, temblor y bradicinesia (85) a la vez que produce un deterioro cognitivo con afectación visual. Se conoce que se desarrolla tras la agregación de α-sinucleína (αSYN) dentro de las neuronas, produciendo pérdida neuronal. A nivel ocular se ha descubierto en estudios ex vivo que la αSYN se deposita en las capas retinianas, más específicamente en la CNI, CPI y CCG (73).

A nivel in vivo, el estudio retiniano con OCT ha albergado información acerca del adelgazamiento y degeneración que existe en la CFNR y la asimetría del contorno foveal en pacientes con EP. Estos estudios han facilitado la evaluación de la enfermedad y han podido proporcionar información pronóstica acerca de la enfermedad y la efectividad terapéutica (86).

En relación a los modelos animales, los modelos clásicos se basan en la administración de fármacos para producir una neurodegeneración dopaminérgica en la sustancia negra y depleción dopaminérgica estrial (87). Gracias a estos modelos se ha podido detectar el depósito de αSYN en las capas retinianas de animales administrados con rotenona junto con una neurodegeneración retiniana estudiada mediante OCT. A su vez comprobaron que la degeneración en la retina aparecía antes que en el cerebro, confirmando que existen alteraciones previas significativas en la retina confirmando el potencial biomarcador de este tejido (88). Existen otros estudios que han permitido hallar la pérdida de fotorreceptores y el depósito de αSYN en las capas de la retina, más concretamente en la capa nuclear interna, pudiendo dar una explicación al síntoma visual del que más informan los pacientes, dificultad en la visión de los colores (89,90). Además de los modelos convencionales, existen modelos genéticos que han permitido observar el depósito de αSYN en las diferentes capas retinianas y correlacionar estos hallazgos con los encontrados en las retinas humanas con EP (91) a la vez que han ayudado a descifrar terapias genéticas para aliviar los defectos motores (92). Con el aumento en investigación se han desarrollado biomarcadores para el diagnóstico de la enfermedad a la par que nuevas y prometedoras estrategias para su tratamiento (93–95)

Enfermedad de Alzheimer (EA)

La EA es la causa más común de demencia en el mundo. Se caracteriza por un deterioro cognitivo y neuronal producido por el acúmulo extracelular de placas de beta-amiloide (βA) y la formación de ovillos neurofibrilares intracelulares formados de proteína tau hiperfosforilada (p-tau) (96).

Existen diversos biomarcadores aceptados para el diagnóstico clínico de la enfermedad como puede ser el hallazgo de βA, tau total (t-tau) y p-tau en el líquido cefalorraquídeo o los cambios neuronales en técnicas de imagen como la tomografía por emisión de positrones (PET). Como se ha podido observar durante toda la sección, los pacientes con patologías neurodegenerativas suelen cursar con signos clínicos que ayudan en el abordaje de la enfermedad. A nivel ocular se han descrito los hallazgos oculares que pueden encontrarse en los pacientes con EA, encontrándose síntomas relacionados con la disfunción visual como es la disminución de la sensibilidad al contraste y de la visión del color, síntomas corneales como es el adelgazamiento corneal, síntomas relacionados con la funcionalidad y adaptabilidad del iris como es

usc UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

el deterioro de las respuestas pupilares fisiológicas entre otros ejemplos. A nivel de la retina y del nervio óptico, los hallazgos de reducción del espesor en las capas retinianas, sobre todo en la capa de fibras nerviosas de la retina junto con la degeneración axonal son los signos más característicos de esta enfermedad (97).

La EA puede dividirse en tres etapas: una EA preclínica en la cual no se van a observar cambios cognitivos en la evaluación clínica ni en biomarcadores; EA con deterioro cognitivo leve y EA con signos ya claros de demencia en cual ya existe una pérdida neuronal importante e irreversible. En este contexto, la investigación con modelos animales es fundamental para poder caracterizar las etapas preclínicas de la enfermedad, estudiar la patogénesis de la EA, evitar el deterioro cognitivo irreversible y encontrar dianas terapéuticas efectivas.

Dentro de los modelos animales, los modelos murinos presentan un pequeño inconveniente, no desarrollan EA de forma espontánea por lo que para es necesario realizar modelos transgénicos para poder estudiar la enfermedad. Uno de los primeros modelos murinos generados expresaba las isoformas del gen APP, se denominó modelo APP derivado de plaquetas (PDAPP) (98). Gracias a este modelo, se pudo determinar el efecto de la inmunoterapia frente a la eliminación de las placas de βA del cerebro, con la consecuente disminución de la progresión de la enfermedad (99). Más tarde se desarrollaron otros modelos con diferentes expresiones génicas de βA que permitieron caracterizar mejor la pérdida neuronal. Con ello se han conseguido diferentes modelos en los que la enfermedad se muestra a tiempos diferentes, pudiendo así focalizar el estudio de la misma (98).

En los últimos años se han desarrollado modelos animales los cuales permiten la expresión de βA y p-tau con el fin de acercarse más a la manifestación humana de la enfermedad y estudiar a la vez ambos fenómenos. Es el caso del modelo 3xTg-AD, uno de los modelos más empleados actualmente o el modelo 5xFAD, el cual cursa con un inicio del deterioro cognitivo muy temprano (100–102). Por último, se han desarrollado también modelos de tauopatía en roedores para estudiar la demencia y los fenómenos relacionados con la acumulación de los ovillos de p-tau como es el modelo P301S. Este modelo será el empleado más adelante en la segunda parte de la presente Tesis Doctoral.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5. Herramientas para la caracterización de modelos animales en oftalmología

Los biomarcadores se consideran herramientas utilizadas en medicina de precisión que poseen tanto un rol clínico como preclínico determinante en la guía de decisiones terapéuticas. Se subclasifican según su orientación predictiva, pronóstica o diagnóstica y a su vez pueden ser moleculares, celulares o de imágenes. A continuación, se exponen tres tecnologías útiles en búsqueda de biomarcadores para la caracterización de modelos animales:

5.1. Tomografía de coherencia óptica (OCT)

La OCT es una técnica de imagen no invasiva que proporciona imágenes tisulares in vivo con resolución micrométrica basada en el principio de interferometría de baja coherencia (103), generando imágenes debido a la interacción del haz de luz con las diferentes estructuras oculares. Gracias a esto, la OCT proporciona información estructural detallada sobre el segmento anterior y posterior del ojo, hallando fenotipos enfermedades oftálmicas sin necesidad de contacto con el tejido u órgano pudiendo realizar el diagnóstico y seguimiento de ciertas patologías y sus tratamientos.

La OCT realiza cortes transversales gracias a las cuales obtiene imágenes in vivo de la morfología de diversas estructuras del segmento anterior y posterior del globo ocular (104,105). Presenta imágenes para la evaluación cualitativa y cuantitativa de las estructuras oculares tales como las diferentes capas de la retina, el nervio óptico, el grosor macular, grosores corneales, medidas de ángulo iridocorneal e incluso medidas del espesor de la película lagrimal (106,107).

El principio de interferometría de baja coherencia permite aumentar o disminuir la intensidad de una fuente de luz mediante la interacción de dos haces de onda (108).

Como se observa en la Figura 4, el haz de luz proporcionado por una fuente puntual se divide en dos haces los cuales uno se refleja en un espejo de referencia, cuya distancia al detector es conocida, y el otro se refleja en el tejido. La diferencia de tiempo con la que los haces se registra en el detector permite analizar y registrar la medida axial (A-scan), la cual informa a qué profundidad se ha producido esa interacción, permitiendo posteriormente medir el espesor del tejido. Para poder obtener una

imagen tomográfica (B-scan) de toda la estructura analizada, el sistema OCT combina múltiples A-scan contiguos para realizar el mapeo completo de la estructura. Finalmente, para conseguir una profundidad de penetración grande en el tejido seleccionado y una alta resolución axial de la imagen, la fuente puntual de luz de la OCT emite haces de luces en el rango del espectro de infrarrojo cercano (103,109).

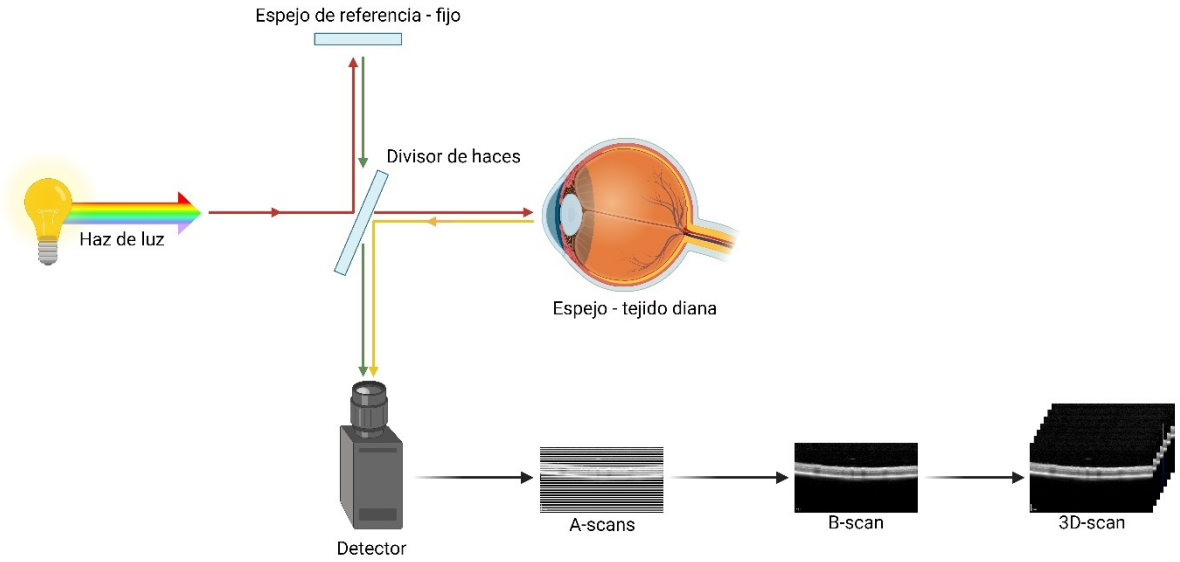


Figura 4. Representación esquemática del principio de funcionamiento de la interferometría de coherencia óptica que emplea el OCT. Creado con BioRender.com.

Existen varias tecnologías de OCT dependiendo de la longitud de coherencia que se emplee y del diseño del instrumento. El primer tipo que salió al mercado modulaba la longitud de referencia en cada exploración de profundidad y de intensidad de fuente de luz, es el llamado OCT de dominio de tiempo (TD-OCT). Aquí la fuente de luz se dirige al interferómetro y se divide el haz de luz en el haz de muestra y en el de referencia, este último irá a parar a un espejo (Figura 4). En este caso, para que instrumento de una imagen la luz reflejada de ambos haces debe coincidir, esto quiere decir que el tiempo que recorre la luz en igual en ambos trayectos. En cuanto al haz de referencia, el espejo que lo capta escaneará la profundidad y la intensidad registrada en el fotodetector proporcionando el A-Scan. Finalmente, mediante el escaneo lateral de la muestra se obtiene el B-scan (103,110). Mas tarde, el desarrollo del OCT de dominio de frecuencia (FD-OCT) permitió mejorar la imagen obtenida debido al empleo de información espectral en la adquisición. Para generar el A-Scan, el OCT emplea la transformada de Fourier, así evita la necesidad de explorar de manera

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

mecánica la distancia del camino óptico. Dentro de esta tecnología se encuentra el OCT de dominio espectral (SD-OCT), el cual reemplaza el haz de luz por un diodo superluminiscente (SLD) y sustituye el detector por un espectrómetro que difracta el frente de ondas de los haces de luz para registrar únicamente imágenes lineales (A-Scan). Con esto lo que se consigue es que la imagen transversal (B-Scan) sea una superposición de patrones de franjas o A-Scan. Esta implementación permite un aumento de la relación señal/ruido y la velocidad de imagen, es decir, añadir la transformada de Fourier y el espectrómetro en la tecnología de la OCT permite imágenes más resolutivas y con mayor profundidad de evaluación (103,110). Gracias a la tecnología del OCT se pueden conseguir imágenes muy resolutivas en estructuras pequeñas. Esto es debido a que las propiedades de las resoluciones axiales y laterales no dependen una de las otras. La resolución axial dependerá de la fuente de luz del muestreo mientras que la resolución lateral dependerá únicamente por el objetivo y el enfoque de la muestra. Esto es de ayuda a la hora de poder adaptar el equipo a todo tipo de tamaños oculares, especies y tejidos (111).

El principio de interferometría del OCT no exime al instrumento de fenómenos de ruido y moteado. Debido a que es un sistema altamente sensible a los cambios de índice de refracción y cuya resolución depende únicamente de la resolución óptica lateral y axial del sistema (112), cualquier interferencia en el sistema puede producir imágenes o hallazgos no deseados por lo que un tejido o estructura estable aumenta la resolución del instrumento y favorece la adquisición de una imagen fiable y buena.

Esta tecnología inicialmente se diseñó cómo instrumento diagnóstico para la evaluación de la retina en la práctica oftálmica clínica en 1991. En 1993 empezaron las primeras pruebas *in vivo* con retinas humanas (113,114) y posteriormente en 1996 salió al mercado el primer OCT. A partir de entonces, la búsqueda por imágenes más resolutivas y que permitiera aumentar la usabilidad permitió el desarrollo de nuevas tecnologías como es el caso de la introducción del OCT de dominio espectral (SD-OCT). Hasta 2006, los instrumentos comercializados con tecnología de OCT solo permitían obtener imágenes transversales del tejido. Es entonces cuando la empresa Heidelberg Engineering desarrolla SPECTRALIS® (Figura 5), una plataforma que combina la tecnología SD-OCT con un oftalmoscopio láser de barrido confocal (cSLO) permitiendo obtener también la imagen in vivo del fondo de ojo a la vez que tenemos imágenes transversales de OCT (115). A su vez, SPECTRALIS® también consta con una tecnología de seguimiento del movimiento ocular (TruTrack™) lo que permite obtener puntos de referencia que facilitan y bloquean el escaneo en esa posición durante la

adquisición. Finalmente cuenta con un software que permite obtener una imagen de fondo de ojo de referencia para asegurar el seguimiento del corte de manera longitudinal (116). Esta tecnología es útil en el manejo de la evaluación de patologías y sobre todo para su posterior control en el desarrollo y seguimiento de terapias.



Figura 5. Fotografía del dispositivo Spectralis® OCT. En la imagen se observa el instrumento OCT adaptado para poder evaluar roedores pequeños como ratón y rata. Para ello se sustituyó la mentonera habitual por una plataforma de poliestireno expandido.

Aunque el globo ocular humano fue el primer órgano en el que se empleó la OCT debido a su accesibilidad, la necesidad de estudiar y comprender los mecanismos de las patologías oculares provocó que se trasladara la tecnología en la primera década de los años 2000 a modelos animales, sobre todo a pequeños animales como los roedores (117–119). Debido a que el tamaño ocular es menor en roedores que en humanos, es necesario modificar la física del instrumento para poder conseguir la misma resolución de imagen. Uno de los enfoques empleados consiste en sustituir el diseño de la lente del objetivo por una lente de mayor poder dióptrico, acortando la distancia focal al ojo, permitiendo el enfoque en las estructuras del ojo del animal. Otro técnica empleada para enfocar el haz de muestra en el ojo del animal, reducir las aberraciones e irregularidades corneales y evitar la deshidratación ocular producida

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

por el no parpadeo, consecuencia directa de la anestesia, es la adición de una lente de contacto rígida en el ojo del animal a la hora de la adquisición de las imágenes (108).

El análisis de la imagen de OCT se presenta en un perfil de intensidades de luz retrodispersada sobre la profundidad del tejido. La retrodispersión o reflectividad se origina a partir de cambios en el índice de refracción dentro del tejido, es decir, las estructuras oculares absorben la luz en función de su estructura molecular y son esos cambios en la estructura microscópica o a la densidad del mismo la que nos permite visualizar in vivo ciertas estructuras por niveles de capas como si de una imagen microscópica se tratara (105,120). Con todo ello, el OCT proporciona unas imágenes en escala de grises que corresponden a las diferentes señales OCT generadas por cada perfil de hiper o hiporreflectividad (Figura 6).

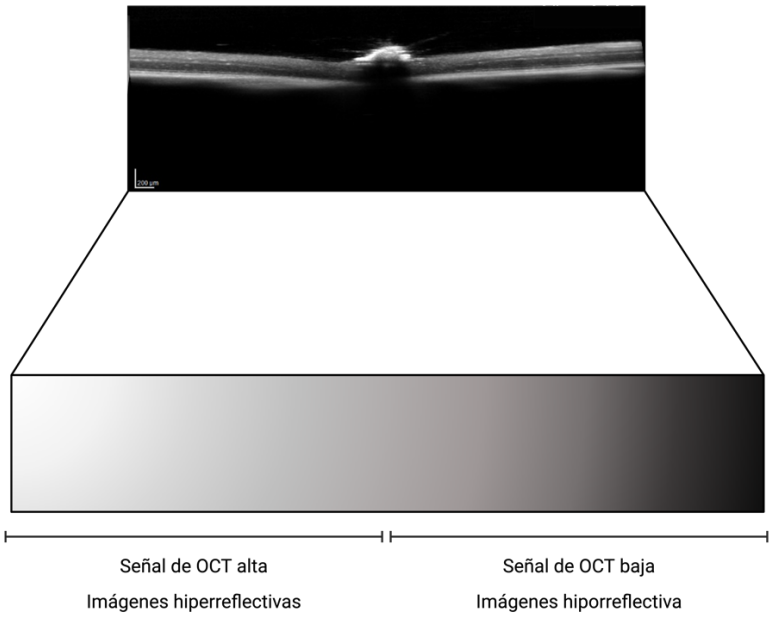


Figura 6. Imagen representativa del tipo de señal que proporciona el tejido y su equivalencia en la escala de grises. Como se observa, las estructuras o tejidos que producen señales altas de OCT serán aquellas que en la imagen de OCT den una imagen más blanca debido a su hiperreflectividad. Al contrario, los tejidos y estructuras que devuelven una señal baja devolverán una imagen más oscura ya que se produce un fenómeno de hiporreflectividad.

- Las zonas hiperreflectivas son aquellas que producen una señal de OCT alta, es decir, bloquean la luz de manera total o parcial y se observan como las zonas más claras de la imagen (Figura 6). Ejemplos de zonas hiperreflectivas en la retina serían la capa de fotorreceptores con su porción más externa (CFE) y

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

EPR. En el segmento anterior, las estructuras más hiperreflectivas serían las capas de la córnea y el iris.

- Las zonas hiporreflectivas dejan pasar la luz ya que no tienen tanta capacidad de reflectividad. Es por ello por lo que se pueden distinguir como las zonas más oscuras de la imagen (Figura 6). En el caso de la retina estamos hablando que las zonas hiporreflectivas serán la CCG, la CPI y externa, y la capa nuclear interna y externa. A su vez la zona de núcleos de los fotorreceptores es la parte más hiporreflectiva de la retina. Existen estructuras y tejidos que por su composición proporcionan también imágenes hiporreflectivas como es el humor vítreo, ya que al ser líquido viscoso que tiene que dejar pasar por completo el haz de luz para generar imagen en la retina, la señal que devuelve es nula. A su vez en el segmento anterior, la zona más hiporreflectiva en condiciones normales sería la cámara anterior ya que alberga el humor acuoso y por su composición permite pasar el haz de luz por completo no proporcionando señal de OCT.

En la figura 7 se pueden observar las zonas hiperreflectivas e hiporreflectivas del segmento anterior y retina de un ratón.

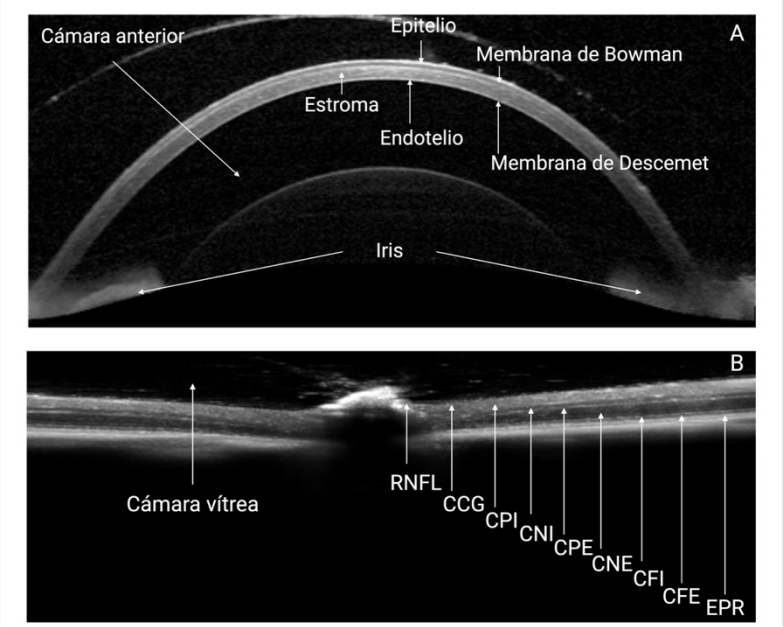


Figura 7. Imagen representativa de OCT de las zonas hiperreflectivas e hiporreflectivas del segmento anterior (A) y segmento posterior (B) de un ratón. Las zonas hiperreflectivas darán una señal más blanca mientras que las zonas hiporreflectivas proporcionarán una menor señal incluso llegando al negro. CCG: capa células ganglionares; CFE: sector externo de la capa de fotorreceptores; CFI: sector interno de la capa de fotorreceptores; CNE: capa nuclear

externa; CNI: capa nuclear interna; CPE: capa plexiforme externa; CPI: capa plexiforme interna; EPE: epitelio pigmentario de la retina; RNFL: capa de fibras nerviosas de la retina.

Con todo ello, el OCT se ha convertido en una herramienta indispensable en la práctica clínica en el diagnóstico y seguimiento de patologías retinianas y maculares como es el glaucoma, enfermedades maculares como la DMAE y retinopatías entre otros ejemplos (121–130). Con el avance de la tecnología, también han avanzado las patologías que pueden verse beneficiadas del uso del OCT como pueden ser patologías de segmento anterior como las cataratas, defectos corneales y enfermedades inflamatorias como la uveítis (131–138). Finalmente se está estudiando su utilidad en la detección precoz y seguimiento de patologías neurodegenerativas como puede ser la Enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson o la Esclerosis Múltiple (139–144).

Aunque su uso se ideó para la práctica clínica diaria ya que nos aporta información interesante a la hora de poder realizar diagnósticos y seguimientos de patologías, la tecnología de la OCT es relativamente nueva y por ello es necesario ahondar más en este instrumento e intentar descubrir más utilidades. Teniendo en cuenta lo anteriormente citado, es fácil poder visualizar una imagen de OCT tanto de segmento anterior como de retina de un humano y diferenciar las diferentes estructuras y capas subyacentes en ellas. Al comparar la imagen de OCT de segmento anterior y posterior entre un roedor y un humano, en el segmento anterior las imágenes que proporciona el sistema son muy similares debido a la distribución y estructuras que comparten ambas especies (Figura 8a y 8b). En el caso de la retina, el hecho de no tener fóvea hace que la imagen de OCT sea más similar a la de un humano con hipoplasia foveal (Figura 8c y 8d). Salvo por esa diferencia, el uso del OCT en investigación preclínica abre las puertas al estudio de patologías humanas, su etiología y fisiopatología, así como permite desarrollar nuevas estrategias terapéuticas que permitan su traslación a la clínica de manera efectiva y segura.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

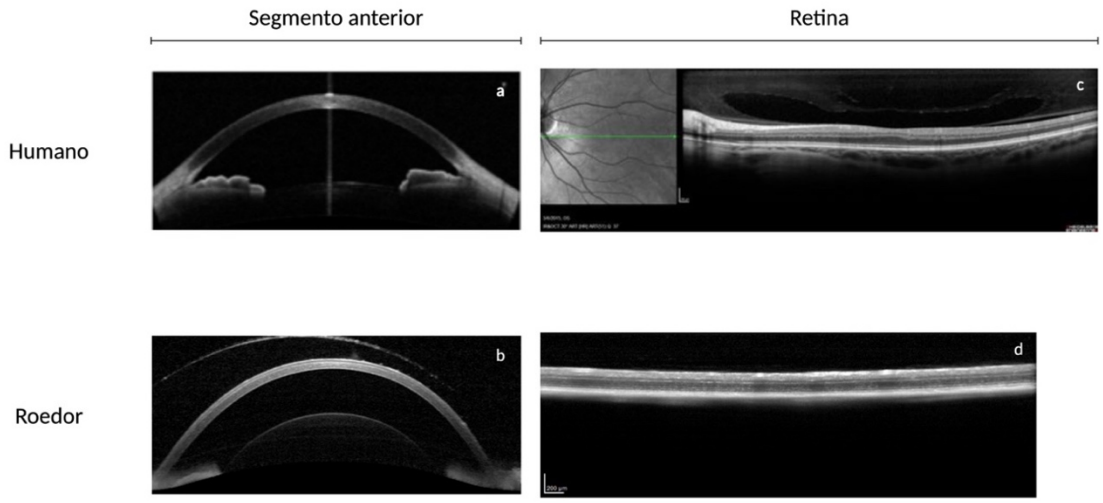


Figura 8. Imagen comparativa entre las estructuras del ojo que pueden observarse por imagen OCT de un humano y un roedor. a) Imagen de OCT de segmento anterior de una córnea sana humana. Imagen obtenida de Ang *et al.* (145). b) Imagen de OCT propia del segmento anterior de una rata Sprague Dawley sana. c) Imagen de la retina de un paciente diagnosticado de hipoplasia foveal. Imagen subida por el Dr. Steven M. Cohen, MD y fue obtenida de la biblioteca de imágenes y vídeos de retina gratuitos y sin derechos de autor de Retina Gallery. d) Imagen de OCT propia de la retina de un ratón sano.

5.2.Tomografía de emisión de positrones (PET)

La PET es una técnica de imagen medica no invasiva que permite el uso de moléculas marcadas radiactivamente para caracterizar la función biológica de los tejidos visualizados (146,147).

El principio físico de la PET se basa en la propiedad que tienen ciertos átomos con núcleos inestables, denominados radioisótopos, de generar positrones en un proceso denominado desintegración beta positiva (Figura 9). Se denomina positrón (e^+) a la antimateria del electrón (e^-), es decir, a la partícula subatómica que contiene la misma carga que el electrón, pero con carga positiva. Toda materia tiende a recuperar un estado estable, en el caso de los radioisótopos el equilibrio se alcanza tras su decaimiento. Durante ese proceso, los radioisótopos generan positrones que chocan con los electrones del cuerpo y se produce la aniquilación de ambas partículas. Esto produce dos fotones altamente energéticos en la misma dirección, pero en sentidos opuestos (148).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

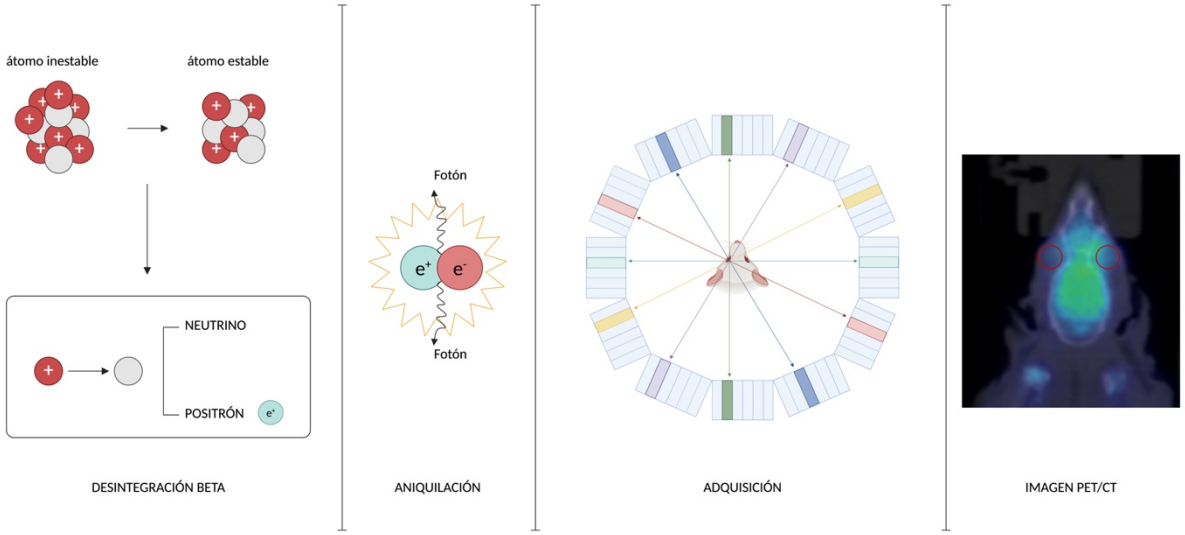


Figura 9. Representación esquemática de los procesos necesarios para poder obtener la imagen PET. Inicialmente un átomo inestable con más protones en su núcleo que neutrones producirá un fenómeno de desintegración beta para poder llegar al equilibrio. Durante esa desintegración, los protones sobrantes se convertirán en neutrones y generarán positrones. Tras esto, los positrones chocarán con los electrones y se producirá la aniquilación de ambas partículas, produciéndose dos fotones que serán captados por los detectores del anillo del PET. Creado con BioRender.com.

Como se puede observar en la figura 9, el instrumento consta de un anillo con unos detectores formados por cristales centelladores. Cada detector está compuesto por un fotomultiplicador, que detecta los fotones coincidentes en el tiempo. El anillo recibe por cada aniquilación, dos fotones en la misma dirección en sentidos opuestos. Con esto, la PET proporciona una imagen de los eventos de aniquilación durante la adquisición, es decir, un mapa de la distribución del radioisótopo, determinando así las imágenes de la tomografía (149). Cuantas más desintegraciones, más cantidad de átomos inestables y por lo tanto más energética será la zona, indicando la acumulación del radioisótopo en una zona determinada del cuerpo.

La imagen funcional del PET da una idea de los procesos que están ocurriendo en el organismo. Es por ello que actualmente se fusiona la imagen fisiológica funcional del PET con imágenes anatómicas para asegurar y obtener una imagen completa de donde están ocurriendo esos procesos (147). Actualmente las técnicas de imagen anatómicas más empleadas son la tomografía axial computarizada (CT) para obtener imágenes PET/CT y la resonancia magnética (RM) para obtener imágenes PET/RM.

Cada radioisótopo tiene características únicas y su uso dependerá de la indicación del estudio. Para ello hay que tener en cuenta el tipo de emisión del radioisótopo, la

energía de emisión y el periodo de semidesintegración radiactiva o tiempo de vida media ($T_{1/2f}$) (150).

- Tipo de emisión del radioisótopo: dependiendo de si el uso es diagnóstico o terapéutico se escogerá un tipo de radioisótopo. Para los estudios de diagnóstico, con el fin de favorecer y evitar lo máximo posible la emisión de radiaciones no beneficiosas, se escogerán radioisótopos que emitan radiación γ o positrones, ya que la interacción con el resto de los tejidos sanos es menor. Si el objetivo del estudio es terapéutico, es necesario emplear radioisótopos emisores de radiación α o β ya que tienen más capacidad de interacción con los tejidos.

- Energía de emisión: para que los cristales del anillo del PET puedan captar los fotones que se producen en la aniquilación, es necesario que los radioisótopos emisores de protones, emitan una energía suficiente equivalente a 511 KeV. Dependiendo de la finalidad del estudio, los radioisótopos que se emplearán serán menos energéticos (diagnóstico) o más energéticos (terapéutico).

- Periodo de semidesintegración radiactiva: comúnmente llamada tiempo de vida medio, define el tiempo necesario para que el radioisótopo decaiga a un estado más estable. Esto es importante ya que se debe escoger el radioisótopo en función al objetivo y al tipo de estudio que se realice para producir la menor alteración no deseable a la fisiología corporal, obtener una especificidad máxima y exponer al sujeto el menor tiempo posible a la radiación.

Teniendo en cuenta lo anteriormente citado, los radioisótopos más empleados en la práctica son el ^{11}C ($T_{1/2f}$=20,4 min), ^{13}N ($T_{1/2f}$=9,97 min), ^{15}O ($T_{1/2f}$=20,4 min), ^{18}F ($T_{1/2f}$=109,8 min), ^{68}Ga ($T_{1/2f}$ =68 min), ^{124}I ($T_{1/2f}$ =4,18 días) y ^{89}Zr ($T_{1/2f}$ =3,3 días) y su uso dependerá de la indicación del estudio y sus características (151,152)

Para poder obtener imágenes PET es necesario administrar un radiofármaco que pueda dirigirse a la zona de interés para poder estudiar los procesos biológicos que estén ocurriendo. Un radiofármaco es producto de la unión de un radioisótopo con moléculas que permitan un diagnóstico o tratamiento. Uno de los radiofármacos más empleados en la clínica es el radiotrazador 18F-Fluoro-2-Deoxi-2-D-Glucosa (18F-FDG), un marcador del metabolismo de la glucosa utilizado para identificar áreas en las que existe un metabolismo de la glucosa anormalmente elevado (153). Es por tanto un análogo de la glucosa que permite obtener información acerca del requerimiento

metabólico del organismo. Para ello es necesario la administración intravenosa del radiofármaco. Este requerimiento limita el inicio de los estudios de imagen a 45 minutos postadministración debido a que es el tiempo en el que el radiofármaco se ha distribuido por completo en el organismo.

La PET tiene una amplia gama de usos, desde la caracterización de enfermedades hasta estudios de biodistribución de anticuerpos y estudios farmacocinéticos (147). En oncología, la imagen PET, combinada con técnicas anatómicas, está ampliamente aceptada para estudios de diagnóstico. A su vez, los injertos sépticos osteoarticulares en endocarditis (154), enfermedad inflamatoria intestinal crónica o infecciones por el virus de inmunodeficiencia humana también pueden verse beneficiadas por esta técnica (155,156). En neurología, los cambios patológicos cerebrales producidos en casos de demencia, como la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson, y el análisis por imagen en pacientes con lesiones cerebrales con epilepsia refractaria son unas de las indicaciones más presentadas para este tipo de técnica (157–159). En las últimas décadas está emergiendo el uso de la imagen PET en oftalmología en el diagnóstico y monitorización de tumores oculares y orbitales (160,161), arteritis temporales (162) y el análisis de los procesos inflamatorios orbitarios, como es en la oftalmopatía de Graves (163) e intraoculares, como en la sarcoidosis o la uveítis (164).

La PET ha demostrado ser altamente sensible en la identificación de la afectación inflamatoria (165). Cuando se produce un proceso inflamatorio, el requerimiento metabólico de la zona aumenta significativamente produciendo un aumento de captación de los radiofármacos con moléculas análogas a la glucosa como es el Fluoro-2-Deoxi-2-D-Glucosa (FDG). Gracias a esto se puede estudiar de manera completa si esos mecanismos inflamatorios afectan solamente de manera local a la zona inflamada o si se puede producir una inflamación generalizada del resto del organismo (166–169)

Finalmente, la imagen PET puede emplearse para el desarrollo de fármacos mediante la caracterización preclínica de la biopermanencia ocular, permitiendo desarrollar formulaciones más estables y con mayor tiempo de retención ocular del fármaco (170–172). A su vez se pueden realizar estudios farmacocinéticos y de biodistribución en estudios preclínicos y clínicos para determinar los niveles de fármaco y analizar cómo y a qué velocidad se elimina este del organismo (173–178).

La utilidad y la investigación en la imagen PET proporciona imágenes valiosas sobre ciertas patologías. La necesidad de implementar esta técnica *in vivo* no invasiva en la

USC DE COMPOSTELA

investigación preclínica proporciona información sobre las bases patológicas de enfermedades humanas y permite hacer estudios que permitan el avance en su diagnóstico y en el desarrollo de fármacos. Para ello cabe destacar que es necesario el desarrollo de instrumentos adaptados al animal que se va a analizar, por lo que se han desarrollado sistemas PET/CT y PET/MR preclínicos capaces de elaborar imágenes del cuerpo de un animal entero, como es en el caso de los roedores rata y ratón. Estos estudios permiten la traslación casi directa de resultados, siguiendo los principios de las tres erres (3R) en investigación animal, para estudiar las patologías humanas y sus posibles tratamientos.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.3.Proteómica

Las proteínas son macromoléculas formadas por cadenas de aminoácidos que desempeñan diferentes funciones en el cuerpo, pueden actuar como enzimas, hormonas, receptores, mediadores inmunitarios, trasportadores y moduladores (179). Cada proteína tendrá unas cadenas de aminoácidos determinadas por mutaciones y cambios en el ARN y por modificaciones postraduccionales de los genes de la proteína (180). Se llama proteoma al conjunto de proteínas que pueden expresarse en una célula, tejido u organismo.

La proteómica es el estudio del proteoma para detectar mecanismos biológicos, biomarcadores, dianas farmacológicas y vías de transmisión de enfermedades (181). A su vez, proporciona información acerca de la función biológica de la célula o tejido siendo una técnica de estudio completa para caracterizar un organismo (182).

Existen dos grandes tipos de métodos de procesado y análisis del proteoma: métodos convencionales y tecnologías de alto rendimiento. Dentro de los métodos convencionales existen diversas técnicas como es la cromatografía, la tinción inmunohistoquímica (IHC), el Western Blot o el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) para el análisis de proteínas selectivas. El inconveniente de estas técnicas convencionales reside en la incapacidad de definir el nivel de expresión de proteínas (183). Para evitar este inconveniente se desarrollaron métodos convencionales avanzados de separación de proteínas complejas como la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE). Con el fin de mejorar las limitaciones de los métodos convencionales, reducir los tiempos de análisis y aumentar la precisión y sensibilidad de los análisis, se desarrollaron métodos de alto rendimiento como la micromatriz de tejidos (TMA), la matriz de vías proteicas y la espectrometría de masas (MS) (180). Gracias a las nuevas técnicas de alto rendimiento se han desarrollado herramientas que permiten analizar grandes volúmenes de datos proteómicos, proporcionando grandes bases de datos sobre el proteoma humano y de otras especies (184,185).

La espectrometría de masas, MS por sus siglas en inglés, es una técnica analítica que permite medir la relación masa/carga de una muestra. Para el análisis proteómico por MS es necesario extraer las proteínas de la muestra a analizar y digerirlas con el fin de conseguir los péptidos definidos de cada proteína. Una vez conseguidos los péptidos, estos generalmente se analizan mediante cromatografía liquida acoplada a un MS (LC-

USC DE COMPOSTELA

MS). Esto permite determinar las proteínas que están presentes en una muestra por el peso molecular de las mismas.

Previo al análisis es necesario un proceso de preparación de la muestra el cual comienza con la lisis y extracción de las proteínas para la obtención de los péptidos mediante el uso de reactivos como solventes orgánicos, desnaturalizantes o detergentes. Los solventes orgánicos permiten solubilizar las proteínas y desnaturalizarlas y son fácilmente eliminables tras su evaporación en el proceso de liofilización. Dentro de los solventes orgánicos más empleados se encuentra el acetonitrilo (ACN). En el caso de los desnaturalizantes y detergentes, estos lisan las células y permiten solubilizar sobre todo las proteínas de membrana. Su principal inconveniente es la dificultad de eliminarlos de la muestra tras su uso, dificultando posteriores análisis independientes. A su vez, al trabajar con detergentes para la lisis y extracción se corre el riesgo de que estos se depositen en el instrumento de medida. Para evitar estos problemas se han desarrollado sistemas de abordaje para degradar los detergentes como es la adición de calor o el mantenimiento de la muestra a un pH ácido. Los desnaturalizantes más empleados son la urea y el clorhidrato de guanidina mientras que en el grupo de los detergentes existen los detergentes iónicos como el dodecil sulfato de sodio (SDS) y los detergentes no iónicos como el Triton X-100. El siguiente paso para poder obtener los péptidos es maximizar la extracción y solubilización de las proteínas, este proceso puede llevarse a cabo por diferentes técnicas como pueden ser ciclos de congelación-descongelación, ciclos de sonicación o disrupción mecánica de la muestra (186).

Una vez la muestra está bien preparada para su lectura se procede al análisis durante el cual, la muestra pasa por tres procesos diferentes. Inicialmente las moléculas de la muestra procesada se transforman en iones en fase gaseosa que serán separados en función de su masa/carga en un segundo proceso gracias a la presencia de campos eléctricos o magnéticos. Por último, el instrumento registrará los iones detectados y los separará en relación al valor masa/carga obtenida consiguiendo así los diferentes pesos moleculares que se encuentran dentro de la muestra (187). Los resultados se representan mediante una gráfica donde se encuentran los diferentes picos cromatográficos y su tiempo de retención. La interpretación y cálculo del área bajo la curva de ese pico cromatográfico permitirá cuantificar los péptidos los cuales podrán emplearse en las bases de datos para obtener información acerca de los tipos de proteínas que contenía la muestra (183). Dentro de las aplicaciones de la proteómica,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

el desarrollo del Proyecto del Proteoma del Ojo Humano ha provocado que los últimos años se le esté dando mayor importancia a la investigación proteómica ocular (181). El ojo es un órgano complejo con cualidades estructurales únicas, por ello, pequeñas alteraciones en ellas pueden provocar problemas de visión y ceguera. Para evitar esto y poder personalizar tratamientos más efectivos y seguros son necesarios nuevos conocimientos más específicos sobre la patogenia de las enfermedades. Estos conocimientos se centran en la caracterización de los tipos de proteínas y la cantidad que presentan ciertas enfermedades oculares comparadas con una célula, tejido u órgano sano para poder realizar un perfil y descubrir biomarcadores que identifiquen esa patología.

La proteómica en modelos animales permite estudiar y desarrollar estrategias eficaces de prevención y tratamiento de ciertas patologías debido a que permite identificar cambios en la expresión y modificación de proteínas que ocurren durante la progresión de las enfermedades. El uso de la proteómica en modelos animales ha permitido identificar biomarcadores potenciales y nuevas dianas terapéuticas.

En un modelo de ojo seco en conejos, se describió el aumento de la proteína S100A6, asociada a la proliferación y diferenciación celular, así como daño en la superficie ocular; la proteína S100A9, proteína asociada a la inflamación y la albúmina sérica (188). Destacar que gracias al estudio proteómico se consiguió describir la proteína pIgR como exclusiva de la enfermedad de ojo seco asociada al síndrome de Sjögren (189). Otro ejemplo del uso de la proteómica en el campo de la preclínica es el análisis proteómico de un modelo de la enfermedad de Behçet. En este estudio, Zheng Z. *et al.* detectaron una proteína diana del virus del herpes simple, un factor patogénico de la enfermedad de Behçet. Mediante la comparación del proteoma de pacientes humanos sanos con un modelo animal murino se pudo hallar que la proteína UL48 se unía más a las muestras de los ratones que expresaban la enfermedad en comparación con los controles sanos (190).

Otros ejemplos son la detección en la retina de proteínas involucradas en la inflamación, estrés oxidativo y apoptosis en un modelo murino de DMAE (191). Otra patología que se ha beneficiado del estudio proteómico de la retina es el glaucoma, debido a que se han conseguido reconocer las alteraciones proteicas presentes en un modelo de glaucoma en ratones que afectaban a la neuroprotección y a la apoptosis de las células ganglionares albergando luz frente a nuevos mecanismos de daño y posibles intervenciones terapéuticas (192).

En el campo de las enfermedades inflamatorias, diferentes modelos animales de uveítis han empleado la proteómica para identificar biomarcadores potenciales y nuevas dianas terapéuticas. En un modelo de ratón de uveítis autoinmune experimental, se analizó el proteoma de la retina de los animales para estudiar las alteraciones de la proteína mitocondrial. Gracias al estudio proteómico se encontró un aumento de cristalinas Aα y βB2 y manganeso-SOD, proteínas que responden frente al estrés oxidativo otorgando protección contra él. La regulación positiva de la cristalina Aα previene el daño inducido a los fotorreceptores ya que evita que el citocromo c se libere al citosol mientras que la regulación positiva de βB2 mantiene la homeostasis del calcio. En el caso de las proteínas que se encontraron reguladas negativamente, se encontraron la ATP sintasa, malato deshidrogenasa y proteínas de unión al nucleótido de guaina, proteínas clave para el buen desarrollo y morfología de las mitocondrias (193). En otro estudio sobre el proteoma de un modelo murino de uveítis autoinmune experimental, Okuniki *et al.* consiguieron identificar el papel de la proteína esterasa D (EstD) en la autoinmunidad de la uveítis humana gracias al análisis por MS de las proteínas retinianas dianas (194). Otras proteínas que se han encontrado aumentadas en diversos modelos animales de uveítis son las cristalinas (195), la calprotectina, un heterodímero de s100A8 y S100A9, la apolipoproteína E y la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) entre otras (196).

La investigación del proteoma ocular proporciona información robusta sobre la patogénesis de muchas enfermedades oculares, así como proporciona una mejora en la capacidad del diagnóstico y monitoreo de las enfermedades, impulsando el desarrollo de terapias personalizas (197,198). Los perfiles proteómicos pueden revelar diferencias individuales en la expresión y modulación de proteínas, proporcionando una base para el diseño de tratamientos específicos que maximicen la eficacia terapéutica e identificando posibles dianas terapéuticas.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

1. Antecedentes

La investigación biosanitaria tiene como objetivo promover y ejecutar actuaciones orientadas a los problemas sanitarios actuales para su posterior traslación y adaptación al escenario clínico. La investigación traslacional permite transferir los conocimientos del laboratorio a los pacientes en el menor tiempo posible por lo que es necesario conocer los problemas reales que se presentan en la práctica asistencial.

Las patologías oftálmicas demandan un incremento en investigación ya que su padecimiento puede afectar a la calidad de vida de millones de personas en todo el mundo, causando ceguera y discapacidad visual.

Los modelos animales preclínicos permiten obtener biomarcadores *in vivo* necesarios para abordar necesidades clínicas no resueltas, así como permiten comprender la etiológica, fisiopatología y evolución de las enfermedades. En este sentido, el desarrollo, caracterización y utilización de modelos animales permiten la traslación de terapias y de estudios a la vez que facilitan el desarrollo de nuevos fármacos y el descubrimiento de nuevos biomarcadores indicadores del estado de la enfermedad y su evolución.

La utilización de equipamientos empleados originalmente en diagnóstico clínico resulta de gran interés para su utilización en investigación preclínica debido al alto nivel de traslación de sus hallazgos. Uno de esos instrumentos es el OCT, una técnica no invasiva en la que se consiguen imágenes morfológicas *in vivo* de tejidos del segmento anterior y posterior gracias a imágenes transversales. La ventaja de evaluar los tejidos de una forma no invasiva otorga al OCT una gran ventaja para evaluar el riesgo, la progresión de la enfermedad y la eficacia terapéutica tanto en modelos animales como en la práctica clínica. Otro equipamiento de imagen que puede emplearse para caracterizar enfermedades y evaluar su eficacia terapéutica es la tomografía de emisión de positrones (PET), una técnica de imagen *in vivo* medica no invasiva que permite el uso de moléculas marcadas radiactivamente para caracterizar la función biológica de los tejidos visualizados (8).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Además del empleo de pruebas de imagen, con la utilización de la proteómica también se puede obtener información sobre los mecanismos biológicos, biomarcadores y dianas farmacológicas que caracterizan una enfermedad. Concretamente, la investigación del proteoma ocular proporciona información robusta tanto en la patogénesis de muchas enfermedades oculares como en la mejora en la capacidad del diagnóstico y monitorización de las enfermedades, impulsando el desarrollo de terapias personalizas.

En la presente Tesis Doctoral, se presenta la caracterización de dos patologías en las que el ojo es protagonista. Por un lado, una patología propia de este órgano como es la uveítis, y otra en la que el ojo sirve como una ''ventana al cerebro'' para monitorizar la evolución de la enfermedad de Alzheimer (EA). En estas patologías, la investigación en el campo preclínico con el empleo de novedosas técnicas de imagen y moleculares, permiten el desarrollo de nuevos biomarcadores para futuros abordajes terapéuticos no resueltos.

La primera parte de esta Tesis Doctoral se centra en el desarrollo y caracterización de dos modelos animales de uveítis, una enfermedad oftálmica inflamatoria con una incidencia, según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), que oscila entre 17 y 52 por 100.000 habitantes al año (199). La heterogeneidad de su etiología provoca que no exista un consenso y una homogeneidad en el tratamiento por lo que se necesita ahondar en la investigación para aumentar el conocimiento de biomarcadores que ayuden al abordaje de la enfermedad (200). Para esta sección, se caracterizarán y compararán dos modelos animales de uveítis aguda inducida para simular una patología idiopática ocular y una uveítis derivada de una patología inflamatoria sistémica.

La segunda parte de esta Tesis Doctoral se basa en la caracterización de los cambios retinianos producidos en un modelo murino de EA. Según la Federación Internacional de Asociaciones de Alzheimer y demencia, los casos de demencia aumentan significativamente conforme avanzan los años, siendo la incidencia de 17,1 por 1.000 personas/año en el 2016 (201). Dentro de la demencia, la EA es uno de los tipos de demencia que más prevalencia tiene dentro de la sociedad y se denomina un trastorno neurodegenerativo progresivo que presenta pérdida de memoria y funciones cognitivas. Se caracteriza por depósitos de placas amiloides en el cerebro, presencia de ovillos neurofibrilares de proteína tau y finalmente pérdida neuronal. Actualmente no existe un abordaje terapéutico efectivo para esta patología por lo que representa un

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

problema de salud publico relevante. La base de este estudio se centra en la necesidad de hallar biomarcadores para este trastorno neurodegenerativo que permitan estudiar la patogénesis de la enfermedad y evitar el deterioro cognitivo irreversible encontrando nuevas dianas terapéuticas efectivas. El ojo, y más específicamente la retina, permite estudiar mediante técnicas de OCT los cambios producidos en el cerebro de manera directa y no invasiva, proporcionando un biomarcador temprano de la enfermedad en la que poder evaluar la progresión de la enfermedad y analizar el efecto terapéutico de potenciales moléculas.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.1.Patologías de segmento anterior: uveítis

La inflamación es una reacción fisiológica de defensa del organismo frente a un agente etiológico que causa un daño determinado. El causante de esas agresiones puede tener un origen endógeno o exógeno. Esta mediada por el sistema inmune innato gracias al cual el organismo es capaz de eliminar el agente patógeno, devolviendo la funcionalidad a la célula, tejido u órgano afectado. Por lo general, la respuesta inflamatoria es capaz de resolver el daño causado en un periodo determinado, restaurando la homeostasis tisular. Sin embargo, existen casos donde el organismo es incapaz de controlar ese mecanismo y provoca la cronicidad de la inflamación (202).

La uveítis es un grupo de enfermedades oculares de diferentes etiologías que implican inflamación del tejido uveal (203). En el año 2005, el International Uveitis Study Group (SUN) estandarizó la nomenclatura de la uveítis y su clasificación. Depende del criterio de clasificación, la uveítis se puede clasificar dependiendo de la zona anatómica afectada, del curso clínico o de la etiología. Una de las clasificaciones realizadas según la localización principal de la inflamación clasificó las uveítis en: uveítis anterior, si la inflamación se localiza principalmente en la cámara anterior; uveítis intermedia, si son la cámara vítrea y la *pars plana* las estructuras más afectadas por la inflamación; uveítis posterior, cuando existe afectación en retina y coroides; y panuveitis, cuando no hay una inflamación mayoritaria en las estructuras mencionadas sino que existe una inflamación ocular más generalizada. A su vez, para describir el curso clínico de la enfermedad se acuñaron tres términos diferentes: uveítis aguda cuando existe un inicio repentino y la enfermedad dura un tiempo limitado; uveítis recurrente si existen episodios repetidos separados por tiempos de inactividad de mínimo 3 sin que haya tratamiento; y uveítis crónica cuando existen recaídas tras la suspensión del tratamiento antes de los 3 meses (Tabla 1) (204).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 1. Clasificación de la enfermedad de uveítis según el grupo de trabajo SUN dependiendo de la zona anatómica afectada y el curso clínico de la enfermedad.

Criterio	Término	Descripción
Zona anatómica	Uveítis anterior	Inflamación mayoritaria en cámara anterior
	Uveítis intermedia	Inflamación mayoritaria en cámara vítrea y *pars plana*
	Uveítis posterior	Afectación en retina y coroides
	Panuveitis	Inflamación ocular más generalizada. No existe una estructura con mayor afectación
Curso clínico	Uveítis aguda	Episodio con inicio repentino y duración limitada
	Uveítis recurrente	Varios episodios. Existen periodos de inactividad sin tratamiento >3 meses
	Uveítis crónica	Varios episodios recurrentes en <3 meses sin tratamiento

La evaluación clínica de la enfermedad incluye una prueba de agudeza visual, un examen de la superficie ocular y de la cámara anterior con lámpara de hendidura y un examen de la cámara vítrea y de la retina con oftalmoscopio (205). De entre las complicaciones oftálmicas más comunes se encuentra el glaucoma, una neuropatía que en algunos casos cursa con presión intraocular elevada y que puede causar daños en el nervio óptico (203,206). A menudo la uveítis puede estar asociada a enfermedades inflamatorias sistémicas por lo que es necesario tener en cuenta las posibles asociaciones para el correcto manejo de la enfermedad y su posterior tratamiento. Actualmente se está abriendo paso el estudio de los cambios oculares con la OCT, proporcionando una herramienta novedosa y rápida para el manejo de esta patología (121,206). La OCT proporciona información estructural detallada sobre el segmento anterior y posterior del ojo, siendo un instrumento útil para detectar las principales complicaciones de la uveítis de forma sencilla y no invasiva. La OCT anterior, también conocida como Tomografía de Coherencia Óptica del Segmento Anterior (AS-OCT) proporciona una imagen detallada de las estructuras de la porción anterior del ojo, permitiendo la evaluación del infiltrado celular, membranas fibróticas y cambios en la morfología del iris, entre otros. Es por ello que el uso del OCT en estudios preclínicos de uveítis ha sido más investigado debido a su reproducibilidad y especificidad en la detección de los principales signos clínicos de la enfermedad (207–210).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

La inflamación de esta patología es consecuencia de una respuesta inmunitaria inducida por la activación mayoritariamente de células T que migran al ojo y desencadenan la cascada inflamatoria. Esto provoca una migración de citoquinas proinflamatorias y produce la permeación de la barrera hematorretiniana causando en muchas veces una ruptura y cambios en la fisiología ocular (203,211,212). Debido a ello, es posible determinar los cambios biológicos ocurridos gracias a la detección de diferentes biomarcadores proteicos en modelos clínicos y preclínicos de la enfermedad (59,213–216). Las razones de la activación de la enfermedad son diversas, puede estar mediada por un trauma, una infección, otras enfermedades inflamatorias sistémicas o puede no tener una causa específica, es decir, ser idiopática (217).

En el estudio de la uveítis, se han realizado numerosos modelos preclínicos para investigar la fisiopatología de la enfermedad y evaluar el potencial de diferentes vías y nuevos tratamientos. Uno de los modelos animales más ampliamente extendido es el modelo animal en rata de uveítis inducida por endotoxina (EIU) mediante la administración de LPS (62). Su administración contribuye a la activación de la cascada inflamatoria, favoreciendo la ruptura de la barrera hematorretiniana al actuar sobre la vía dependiente del receptor tipo Toll 4 (TLR4) (54). La inducción de este modelo animal se ha realizado tradicionalmente mediante la administración sistémica de la endotoxina ya que la ruptura de las barreras vasculares permite la migración de células inmunes a todo el cuerpo, incluido el ojo. Debido a este fenómeno, la administración sistémica permite que este modelo pueda ser usado no solo como modelo de uveítis sino como otros modelos de inflamación (218–220). Esto permite fenotipar aquellas uveítis cuyas causas son otras enfermedades inflamatorias sistémicas. En la clínica, entre el 30 y 60% de las uveítis son idiopáticas (199) por lo que es necesario el estudio de la enfermedad con los mínimos condicionantes sistémicos, por ello se desarrollaron modelos con vías de administración más locales, como la administración intravítrea, para estudiar y caracterizar la uveítis aguda producida por el LPS.

Existen pocos trabajos que estudien las diferencias fenotípicas en modelos de uveítis en función del tipo de administración de endotoxinas (221,222). A su vez, la comparación de los modelos según el tipo de administración y su efecto sobre la inflamación ocular se ha estudiado a través de la cuantificación y análisis de estudios *ex vivo* por lo que el análisis con técnicas de imagen *in vivo* puede favorecer al desarrollo de nuevos biomarcadores para posteriores estudios farmacológicos.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.2.Patologías de segmento posterior: enfermedad de Alzheimer (EA)

El número de pacientes que presentarán demencia en 2050 se incrementarán en un 250% en relación con los casos del 2019, estimándose un total de 131,5 millones de casos a nivel mundial (223), provocando un incremento del gasto asociado a los cuidados relacionados con la enfermedad y una disminución de la calidad de vida de los enfermos y cuidadores.

Los pacientes con EA cursan con pérdida de la memoria, del lenguaje, del razonamiento, de la consciencia espacial y de la movilidad provocado por el deterioro cognitivo y motor del SNC. Además de estos síntomas, los pacientes con EA a menudo tienen cambios conductuales y anímicos como son la ansiedad, depresión e incluso delirios propios de la enfermedad.

En términos generales, la fisiopatología de la enfermedad del Alzheimer se basa en la acumulación extracelular de placas de βA y ovillos neurofibrilares de p-tau, lo que conlleva a una pérdida neuronal. Gracias a la investigación se conoce que la predisposición genética, la gliosis, la inflamación, el estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial y la acumulación de hierro en el cerebro están involucrados e interrelacionados en la enfermedad (224). El diagnóstico de la EA se realiza principalmente en etapas clínicas cuando el paciente empieza a desarrollar cambios cognitivos o conductuales mediante pruebas cognitivas, de neuroimagen o con biomarcadores aceptados (225). El desarrollo de nuevos biomarcadores no invasivos que permitan detectar la enfermedad en estadios tempranos permitirá iniciar y desarrollar tratamientos que ralenticen o incluso frenen su progresión.

La retina es un tejido ocular con origen embrionario común al SNC. Está compuesta por células neuronales y gliales que permiten que se considere una extensión sensorial del cerebro. Contiene una estructura, denominada nervio óptico, que está compuesta por los axones de las células ganglionares y que está conectada directamente con el cerebro. A su vez, presenta una barrera hematorretiniana con características funcionales comunes a la barrera hematoencefálica cerebral como es el impedir el paso de sustancias no deseables a la retina, permitir el transporte de líquidos y solutos y permitir la alta proliferación de células endoteliales (226). Todo esto permite a la retina ser una ''ventana al cerebro'' y analizar de manera no invasiva mediante su estudio los posibles cambios en patologías cerebrales. Numerosos estudios han estudiado los cambios oculares en pacientes y modelos animales de EA (227), asociando la

enfermedad a cambios cerebrovasculares observados de igual manera en los vasos retinianos (228–231). Además de los cambios vasculares, los estudios revelan que el nervio óptico sufre una atrofia ligada a la pérdida de células ganglionares, señalando que la neurodegeneración no solamente afecta al cerebro, sino que la retina sufre un daño relacionado, proporcionando así un biomarcador temprano de la enfermedad. Estudios en humanos con OCT a su vez indican un adelgazamiento de las capas de la retina sobre todo de en la zona peripapilar de la capa de fibras nerviosas (pRNFL) en los cuadrantes superior e inferior, donde se localizan más los axones de gran tamaño, y de las capas más internas (232).

Varias hipótesis etiológicas han tratado de simular la EA en modelos animales mediante la combinación y creación de diferentes modelos animales. Así pues, se han desarrollado diferentes modelos animales que han permitido estudiar las alteraciones oculares y correlacionar esos hallazgos con los signos encontrados en pacientes con EA (233,234). El estudio con modelos animales ha facilitado a su vez el avance en potenciales terapias de la EA, ejemplo de esto es el ácido salvianólico B para regular la acumulación de depósitos de βA (235); el péptido wtTIDM frente a la formación de ovillos neurofibrilares de p-tau (236); y el anticuerpo 12A12 para reducir la acumulación de βA en el hipocampo cerebral y en la retina (237) entre otros.

En este contexto, la búsqueda de nuevos biomarcadores en modelos murinos de demencia, así como el uso de técnicas de imagen in vivo como es el OCT permitiría caracterizar y monitorizar la enfermedad y por lo tanto facilitar el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2. Objetivos

Considerando las reflexiones previas, el objetivo principal de esta Tesis Doctoral es caracterizar modelos animales de patologías con afectaciones oculares con la utilización de novedosas técnicas de imagen y moleculares.

Para lograr este propósito, se plantean los siguientes objetivos específicos:

1. **Caracterización preclínica de dos modelos de EIU, idiopática y sistémica, a través de dos vías de administración, con técnicas de imagen no invasivas y posterior realización de un estudio proteómico del globo ocular.**

   1.1. Realizar un modelo de uveítis idiopática y un modelo de uveítis sistémica mediante dos vías diferentes de administración y analizar los cambios producidos en el segmento anterior de los modelos inducidos mediante técnicas de imagen no invasivas de AS-OCT.

   1.2. Evaluar si los modelos animales de EIU producen cambios en la PIO.

   1.3. Caracterizar y evaluar mediante PET/CT la inflamación ocular y sistémica.

   1.4. Hallar biomarcadores proteómicos específicos de la enfermedad.

   1.5. Comparar los hallazgos encontrados entre los dos modelos animales.

2. **Caracterización preclínica longitudinal de un modelo de tauopatía mediante imagen OCT.**

   2.1. Analizar y caracterizar longitudinalmente los cambios en el fondo de ojo y en el espesor retiniano.

   2.2. Caracterizar la presión intraocular de los animales con tauopatía para hallar posibles correlaciones con otras patologías oftálmicas.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

PLAN DE TRABAJO Y METODOLOGÍA

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

PLAN DE TRABAJO Y METODOLOGÍA

1. Plan de trabajo

La organización de esta Tesis Doctoral cumple con la normativa de la Escuela de Doctorado Internacional de la Universidad de Santiago de Compostela (España) en cuanto a estructura del trabajo, lenguaje, ética y derechos de propiedad intelectual.

De acuerdo con los objetivos planteados, esta Tesis Doctoral se presenta como monográfica con reproducción parcial de un artículo original. Incluye la caracterización preclínica de dos modelos animales con afectación oftálmica mediante el uso de novedosas herramientas de imagen y moleculares que ayuden en futuros tratamientos farmacológicos.

La primera sección está enfocada en una patología que afecta principalmente al segmento anterior del ojo, y se centrará en caracterizar dos modelos de uveítis inducida por endotoxina, un modelo de uveítis idiopática mediante administración local de la endotoxina y un modelo de uveítis sistémica mediante administración subcutánea de la endotoxina. Para la caracterización se emplean novedosas técnicas de imagen no invasivas. Finalmente se realiza una comparación entre ambos modelos a la par que un estudio proteómico de los modelos evaluados.

Los objetivos de la segunda sección se enfocan en el estudio de una patología cerebral que puede ser estudiada a través del segmento posterior del ojo. Para esto, se ha planteado un estudio longitudinal de un año de duración, en donde se analizarán los cambios retinianos de un modelo animal modificado genéticamente para desarrollar tauopatía.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2. Metodología

Caracterización preclínica de dos modelos animales de uveítis por inducción de endotoxina usando OCT, PET/CT y proteómica

Resumen gráfico:

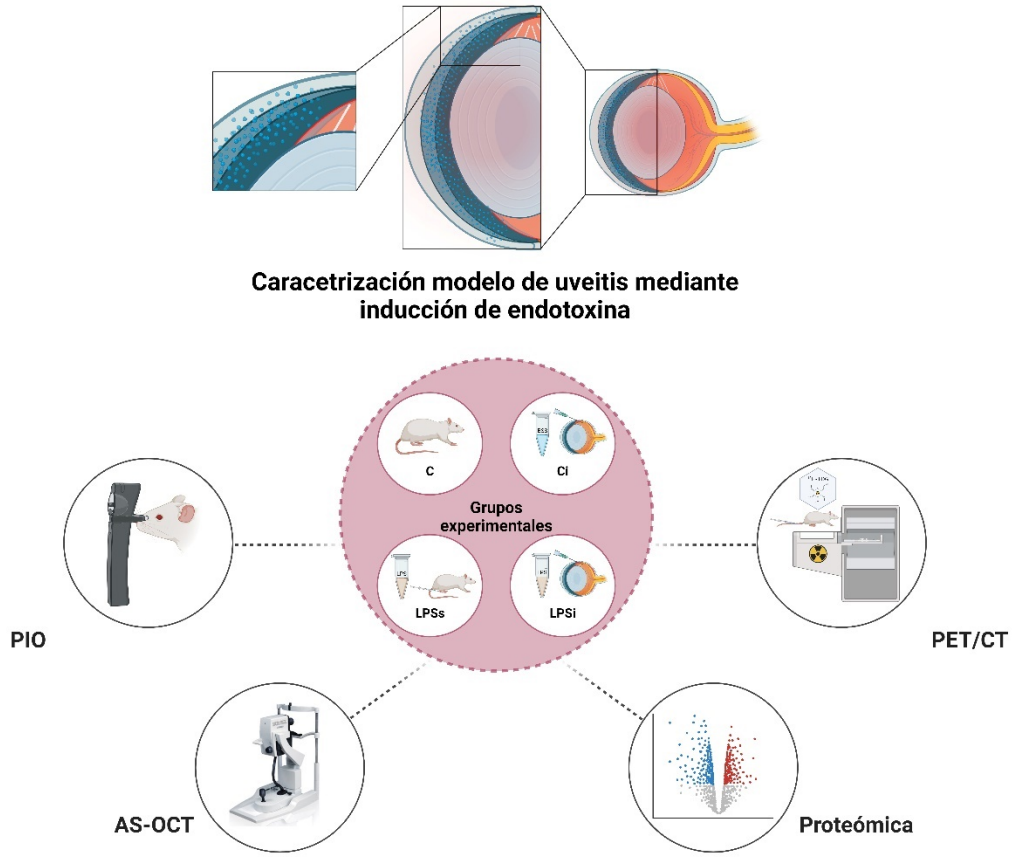


Figura 10. Resumen gráfico donde se observan los estudios realizados en la caracterización preclínica del modelo de uveítis por inducción de endotoxina usando OCT, PET/CT y proteómica. AS-OCT: tomografía de coherencia óptica de segmento anterior; C: grupo control ratas sanas; Ci: grupo BSS intravítreo; LPSi: grupo EIU intravítreo; LPSs: grupo EIU sistémico; PET/CT: tomografía de emisión de positrones y tomografía computarizada; PIO: presión intraocular. Creado con BioRender.com.

Animales

Se utilizaron un total de veintinueve ratas macho Sprague Dawley suministradas por el Centro de Biomedicina Experimental de Galicia de la Universidad de Santiago de Compostela (CEBEGA, Santiago de Compostela, España). El peso medio de los animales fue 262 ± 14 g y la edad fue de seis semanas. Los animales se mantuvieron con alimento y agua *ad libitum* en condiciones SPF con humedad (41 ± 1,8%) y temperatura (23,5 ± 0,5°C) controlada con ciclos día-noche regulados de 12 horas. Los animales fueron tratados de acuerdo con la declaración ARVO para el uso de animales en investigaciones oftálmicas y de la visión, así como con las directrices aprobadas para animales de laboratorio (238,239). Los protocolos del estudio fueron aprobados por el Comité de Ética de Investigación del Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela (IDIS) (15012/2021/001) y siguieron la normativa española y de la Unión Europea (UE) (86/609/CEE, 2003/ 65/CE, 2010/63/UE, RD 1201/2005 y RD53/2013).

Para determinar el grado de inflamación ocular, se utilizaron veinte ratas en las mediciones de PIO, estudios de imágenes OCT y proteómica. Para las mediciones de PIO y estudios de OCT, los animales fueron evaluados en 4 grupos homogéneos: un grupo control de ratas sanas (C, n=5, 10 ojos), otro grupo control en el que se inyectó BSS por vía intravítrea (Ci, n=5, 10 ojos), un grupo de EIU inducido mediante administración sistémica (LPSs, n = 5, 10 ojos) y un segundo grupo de EIU inducido mediante administración intravítrea (LPSi, n = 5, 10 ojos). Para el estudio proteómico se utilizaron 5 ojos de cada grupo (un ojo por rata).

Tras estudiar la posible existencia de inflamación asociada a la administración de LPS, los nueve animales restantes se utilizaron en la caracterización de ambos modelos de uveítis mediante PET/CT con FDG. Este estudio proporciona información sobre la inflamación de todo el cuerpo, así como la producida en el ojo. Los animales se dividieron en tres grupos: grupo control de animales sanos (FDG-C, n=3, 6 ojos), grupo de uveítis inducida por vía sistémica (FDG-LPSs, n=3, 6 ojos) y grupo de uveítis inducida por vía intravítrea (FDG-LPSi, n = 3, 6 ojos). Al final de los experimentos in vivo, los animales fueron sacrificados mediante inhalación de dióxido de carbono. El diseño experimental del estudio se muestra en la Figura 11.

En la figura 12 se encuentra un video ejemplo explicativo con los procedimientos de PIO y OCT realizados durante este estudio.

USC DE COMPOSTELA

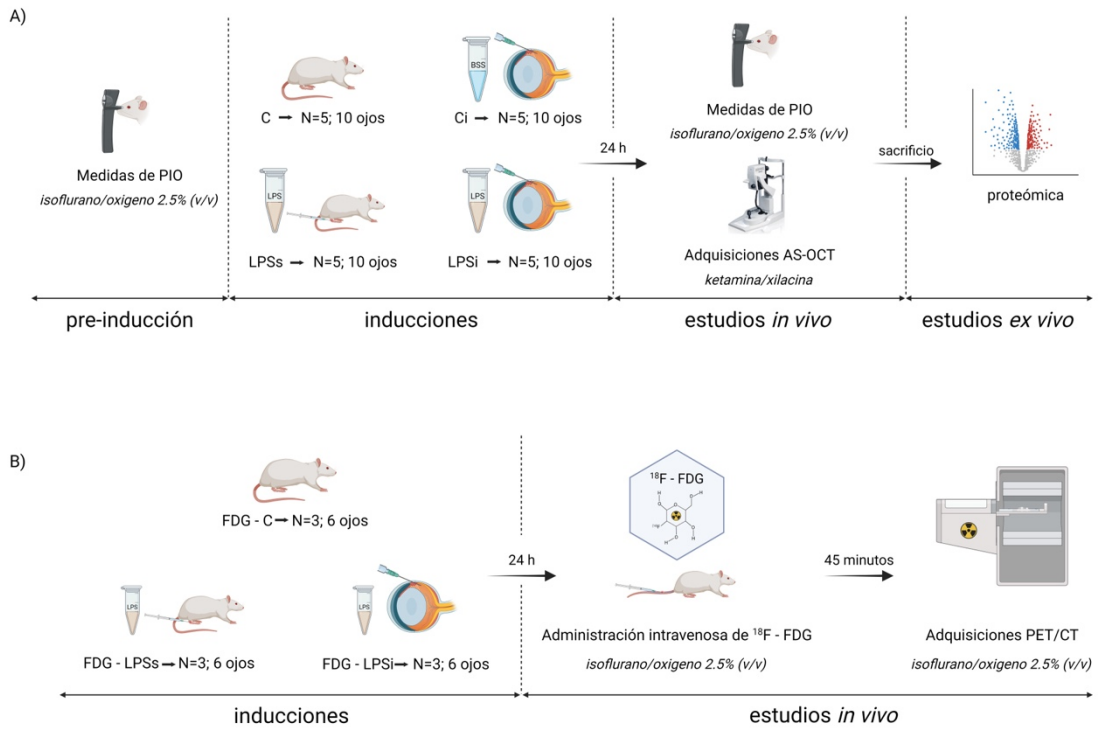


Figura 11. Diseño experimental de los diferentes estudios: A) Mediciones de PIO, estudios de imagen AS-OCT y proteómica para los cuatro grupos experimentales (control (C), control intravítreo (Ci), uveítis inducida por vía sistémica (LPS) y uveítis inducida por administración intravítrea (LPSi)). B) Estudios de imagen PET/CT. Inducciones del grupo control (C) y del modelo EIU de los grupos LPS y LPSi, administración intravenosa de ^{18}F-FDG y adquisiciones PET/CT. Creado con BioRender.com.



Figura 12. Ensayo in vivo y video ejemplo explicativo de los procedimientos de PIO y OCT (código QR).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Modelo de uveítis idiopático y sistémico inducida por endotoxinas (modelo EIU)

Se generaron dos tipos de modelos de EIU: inducción mediante administración intravítrea (modelo idiopático) e inducción mediante administración sistémica (modelo sistémico). Para la inducción del modelo idiopático (LPSi), se inyectaron por vía intravítrea 2 µl de LPS disuelto en PBS a una concentración de 0,125 µg/ml (250 ng de LPS) en la cámara vítrea vía *pars plana* utilizando una jeringa Hamilton con una aguja de calibre 35G siguiendo el protocolo de García- Otero X. *et al*. (166,240).

Para el modelo sistémico (LPSs), se realizó el mismo protocolo utilizado según la literatura inyectando en la pata derecha del animal 1 mg/kg de endotoxina LPS de Escherichia coli (Sigma-Aldrich, Sant Louis, EE. UU.) diluida en solución salina balanceada 0.1% (BSS™, Alcon Healthcare, Texas, USA) (166,212,240,241).

Para el grupo Ci, se administraron 2 µL de BSS por vía intravítrea en cada ojo con una lámpara quirúrgica utilizando una jeringa Hamilton con una aguja de calibre 35G (175,242).

Antes de la inducción de la uveítis, los animales fueron anestesiados en una cámara de gas con una mezcla al 3% (v/v) de isoflurano/oxígeno (Baxter®, Deerfield, Illinois, EE.UU.). Durante las inducciones, los animales fueron anestesiados en una plataforma con una mascarilla con 2-2,5% de isoflurano/oxígeno. Antes de la inyección intravítrea, a los animales se les instiló en ambos ojos un colirio anestésico tópico (1 mg/ml de clorhidrato de tetracaína, 4 mg/ml de clorhidrato de oxibuprocaína; Colircusí® anestésico doble, Alcon Healthcare, Texas, EE. UU.) seguido de un colirio midriático (10 mg/ml de clorhidrato de ciclopentolato; Colirofta® Ciclopléjico, Alcon Healthcare, Texas, EE. UU.).

Los modelos de inducción y la inyección intravítrea de BSS se realizaron 24 horas antes de los estudios, en base al máximo pico de inflamación alcanzado en ese momento según la bibliografía científica. Finalmente, y previo a los procedimientos de obtención de imágenes se evaluó mediante una lampara quirúrgica la integridad del ojo, incluido el posible daño del cristalino y hemorragia después de la inyección intravítrea.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Mediciones de presión intraocular (PIO)

Todos los animales incluidos en el estudio de PIO fueron evaluados en dos momentos diferentes (antes de la inducción o inyección y 24 horas después de la inducción o inyección). Para garantizar la integridad ocular, la medición de la PIO se realizó antes de la dilatación de la pupila y la adquisición de AS-OCT. Para ello, los animales fueron previamente anestesiados con isoflurano/oxígeno al 3,0% y las mediciones se realizaron sobre una plataforma plana en posición decúbito prono. El instrumento utilizado para la medición de la PIO fue un tonómetro de rebote para roedores previamente calibrado para ratas (iCare TonoLab, Icare, Finlandia, Oy). Cada medición consistió en 6 medidas de rebote y se realizaron triplicados de cada medición.

Adquisición OCT y análisis de imágenes

Antes de la adquisición de la OCT, los animales fueron anestesiados mediante inyección intraperitoneal de una mezcla de 75 mg/kg de Ketamina (Ketolar 50 mg/ml, Pfizer, Madrid, ES) y 10 mg/kg de Xilacina (Nerfasin 20 mg/ml, Fatro Iberica, Barcelona, ES). Posteriormente se instiló una gota de colirio midriático (10 mg/ml de clorhidrato de ciclopentolato; Colirofta® Ciclopléjico, Alcon Healthcare, Texas, EE. UU.) y una gota de lágrima artificial (3 mg/ml de hipromelosa y 5,5 mg/ml de cloruro de sodio; ACUOLENS®, Alcon Healthcare, Texas, EE. UU.) para dilatar la pupila y evitar en la medida de lo posible la sequedad de la superficie ocular y las cataratas espontáneas provocadas por la anestesia.

Después de comprobar que los animales estaban completamente anestesiados, se trasladaron al sistema Spectralis® OCT para realizar un examen estructural de la cámara anterior y de la retina. Durante todo el procedimiento, los animales se mantuvieron sobre una plataforma plana con una manta calefactora para evitar una posible hipotermia provocada por la exposición prolongada a la anestesia (243,244). Cada animal se colocó en posición decúbito prono con el ojo perpendicular a la lente del instrumento para garantizar la máxima calidad de imagen axial.

Para este estudio se utilizó un sistema SD-OCT (SPECTRALIS® OCT, Heidelberg Engineering, Alemania). Se introdujeron modificaciones en el software clínico, como la adaptación manual del punto de referencia axial, para evaluar las estructuras

oculares de los roedores. Spectralis® consiste en un escáner láser confocal (cSLO) conectado a un SD-OCT para proporcionar imágenes infrarrojas (IR) y escaneo OCT. La longitud de onda del láser IR y OCT-cSLO utilizados fue de 815 y 880 nm, respectivamente, con una velocidad de exploración de 40 kHz/85 kHz en imágenes de retina. Para el estudio estructural de la cámara anterior se utilizó una lente +21 D. Además, si la evolución de la enfermedad lo permitía, se realizó un posterior examen de retina mediante un estudio volumétrico centrado en el nervio óptico.

Para el examen tridimensional del segmento anterior, se examinó toda la imagen OCT utilizando un patrón de 81 B-scans con un patrón de tamaño de 8 x 5,6 mm (axial x lateral) y la distancia entre B-scans fue de 69 μm. Para cada ojo se eligió una región de interés formada por aquella con el máximo número de B-scans, excluyendo aquellas que no proporcionaban información completa sobre la estructura de la cámara anterior.

Se evaluaron los signos oculares. en tres imágenes de cinco regiones para cada animal (centro corneal, media superior, superior, media inferior e inferior). Los signos clínicos se compararon con la imagen de la cámara anterior de animales de control sanos. Los cambios en la estructura de la cámara anterior consistieron en signos claros de inflamación característicos de la enfermedad de uveítis, como infiltrado celular, presencia de membrana fibrótica e inflamación del iris y del cuerpo ciliar. Se evaluó la presencia de turbidez e infiltrado celular en la cámara vítrea en los casos en que se pudo realizar el examen del segmento posterior.

Estudio proteómico

Preparación de proteínas para análisis proteómico

Los ojos completos se homogeneizaron en Trizol (Merck, Darmstadt, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante y el extracto proteico se mezcló en una proporción de 1:1 en 8 M de urea en 1 M de TRIS – HCl, pH 8,0 y SDS al 1 % en PBS (Sigma Aldrich, San Louis, EE. UU.). La proteína total se cuantificó mediante el ensayo de ácido bicinconínico (BCA, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). Se procesaron cantidades iguales de proteínas como describió anteriormente López-López M. *et al*. (245). Brevemente, las muestras se cargaron en un gel de SDS-PAGE al 10 %. La ejecución se detuvo tan pronto como el frente penetró 3 mm en el gel de

resolución. La banda de proteína se detectó mediante Sypro® Ruby Protein Gel Stain (Lonza, Visp, Suiza), se cortó y se procesó para digestión tríptica manual en gel como lo describen Shevchenko *et al.* (246). Los péptidos se extrajeron realizando tres incubaciones de 20 minutos en 40 μL de ACN al 60% disuelto en ácido fórmico (AF) al 0,5%. Los extractos peptídicos resultantes se combinaron y posteriormente se concentraron en un evaporador centrífugo (Genevac miVac, SP Genevac™ SCIENTIFIC, Warminster, PA, EE. UU.). Finalmente se almacenaron a -20 °C hasta que se realizó el ensayo de espectrofotometría de masas (MS).

Generación de biblioteca espectral mediante adquisición dependiente de datos

Para construir las bibliotecas espectrales de MS/MS, las soluciones de péptidos se analizaron mediante un enfoque de adquisición dependiente de datos (DDA) utilizando microcromatografía líquida-MS/MS (micro-LC-MS/MS). Para obtener una buena representación de los péptidos y proteínas presentes en todas las muestras, se prepararon viales combinados de muestras de cada grupo utilizando una mezcla igual de las muestras originales. Se separaron 4 μl de cada conjunto en un sistema micro-LC Ekspert nLC425 (Eksigen, Dublin, CA, EE. UU.) utilizando una columna YCM-TriartC18 (150 μm × 0,3 mm, 12 nm, s-3 μm) (YMC CO, Japón) a un flujo de 5 μl/min. Se usaron agua y ACN, ambos con 0,1% de AF, como disolventes A y B, respectivamente. Se comenzó con un gradiente de disolvente B del 5 % al 95 % durante 30 minutos, posteriormente y en un tiempo de 5 minutos se cambió el gradiente a 90 % de B y finalmente 5 minutos al 5 % B para el equilibrio de la columna, para un tiempo total de ejecución de 40 min. A medida que los péptidos eluían, se inyectaron directamente en un híbrido cuadrupolo-TOF MS Triple TOF 6600 (Sciex, Redwood City, CA, EE. UU.) operado con un sistema de adquisición dependiente de datos en modo de iones positivos. Se utilizó una fuente Micro (Sciex, Redwood City, CA, EE. UU.) para la interfaz entre microLC y MS, con una aplicación de voltaje de 2600 V. El modo de adquisición consistió en un escaneo MS de 250 ms de 400 a 1250 m/z seguido de un escaneo MS/MS de 100 a 1500 m/z (tiempo de adquisición de 25 ms) de los 65 iones precursores principales del escaneo de estudio, para un tiempo de ciclo total de 2,8 segundos. Posteriormente, los precursores fragmentados se agregaron a una lista de exclusión dinámica durante 15 segundos. Todos los iones con carga única se excluyeron del análisis MS/MS.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Las identificaciones de péptidos y proteínas se realizaron utilizando el software Protein Pilot (versión 5.0.1, Sciex, Redwood City, CA, EE. UU.) de la base de datos Rattus Novergicus Uniprot (disponible gratuitamente en https://www.uniprot.org/. Versión de la base de datos 2023_05 con 8313 proteínas), especificando yodoacetamida como alquilación de Cys. La tasa de descubrimiento falso (FDR) se estableció en 1 tanto para péptidos como para proteínas. Tras la identificación, los espectros MS/MS de los péptidos se usaron para generar la biblioteca espectral para su posterior extracción de picos SWATH usando el complemento MS/MS y ALL con SWATH de adquisición de MicroApp (versión 2.0, Sciex, Redwood City, CA, EE. UU.) para el software PeakView (versión 2.2, Sciex, Redwood City, CA, EE. UU.). Se incluyeron los péptidos con una puntuación de confianza superior al 99 % (según los obtenidos de la búsqueda en la base de datos Protein Pilot).

Cuantificación relativa por adquisición SWATH

La adquisición de ventana secuencial de todos los espectros de masas teóricos (SWATH - MS) se realizó en un sistema TripleTOF® 6600 LC-MS/MS (Sciex, Redwood City, CA, EE. UU.). Las muestras de lágrimas se analizaron utilizando un método de adquisición independiente de datos (DIA), realizando 3 réplicas técnicas para cada muestra (12 muestras en total). Cada muestra (4 µl) se analizó utilizando el equipo LC-MS con el mismo gradiente descrito anteriormente para construir la biblioteca espectral. Para la adquisición se empleó el método SWATH-MS, el cual consiste en repetir un ciclo de 65 escaneos TOF MS/MS de ventanas de aislamiento de precursores secuenciales superpuestas de ancho variable (superposición de 1 m/z) que cubrían el rango de masa de 400 a 1250 m/z con un escaneo TOF MS previo (400 a 1500 m/z, tiempo de adquisición de 50 ms) para cada ciclo. El tiempo total del ciclo fue de 6,3 s. Para cada conjunto de muestras, el ancho de las 100 ventanas variables se optimizó de acuerdo con la densidad de iones encontrada en las ejecuciones de DDA utilizando una hoja de trabajo de calculadora de ventanas variables SWATH de Sciex.

Análisis de datos proteómicos

La extracción de datos del cromatograma se realizó mediante PeakView (versión 2.2) utilizando SWATH Acquisition MicroApp (versión 2.0). Esta aplicación procesó

los datos utilizando la biblioteca espectral creada a partir de los datos brutos. Se seleccionaron hasta 10 péptidos por proteína y 7 fragmentos/transiciones por péptido, en función de la intensidad de la señal. Se excluyeron del procesado aquellos péptidos que se encontraban compartidos o modificados. Se utilizaron ventanas de cinco minutos y anchos de 30 partes por millón (ppm) para extraer los cromatogramas iónicos. Los tiempos de retención de los péptidos que se seleccionaron para cada proteína se realinearon en cada ejecución de acuerdo con los péptidos del tiempo de retención interna (iRT) correspondientes a las diferentes proteínas identificadas en cada muestra y eluyeron a lo largo del eje de tiempo completo. Se generaron los cromatogramas extraídos para cada fragmento seleccionado las áreas de los picos de los péptidos. La cuantificación de proteínas se calculó sumando las áreas de los picos de los péptidos correspondientes.

Las áreas de pico integradas (archivos .mrkvw procesados de PeakView) se exportaron directamente al software MarkerView (Sciex, Redwood City, CA, EE. UU.) para un análisis cuantitativo relativo. Se llevó a cabo una normalización global basada en la suma total de todas las áreas de picos extraídas de todos los péptidos y las transiciones entre las réplicas de cada muestra. El área promedio del pico de obtenido de cada proteína se derivó de las réplicas de SWATH-MS de cada muestra. Posteriormente se realizó un análisis de la prueba t de Student utilizando el software MarkerView para la comparación entre las muestras en función de las sumas de área promediadas de todas las transiciones derivadas para cada proteína. El análisis de red se realizó con String DB 12.0 (disponible gratuitamente en https://string-db.org/) y se utilizó el software de trazado SR (https://www.uniprot.org/) para la visualización. Los archivos de datos sin procesar se encuentran disponibles en el dominio público a través del repositorio MassIVE (ftp://massive.ucsd.edu/v06/MSV000093177/).

Adquisición PET/CT y análisis de imágenes

Una vez estudiado el nivel de inflamación ocular en los modelos de uveítis y la existencia de inflamación asociada a LPS, se utilizó un sistema PET/CT preclínico (Albira PET/CT Preclinical scanner, Bruker Biospin Corp. Billerica, MA) para comparar la inflamación de cuerpo entero y ojos. Para ello se realizó un estudio PET/CT con ^{18}F-FDG en tres grupos de 3 ratas cada uno: FDG-C, FDG-LPSs y FDG-LPSi. La administración del radiofármaco se realizó 24 horas después de la inducción

de la uveítis. Los animales estuvieron en ayunas durante 12 h antes de los estudios de ^{18}F-FDG-PET/CT.

Se midieron los niveles de glucosa antes de la inyección de ^{18}F-FDG (114,67 ± 13,78 mg/dl). Posteriormente, se administraron por vía intravenosa 14,22 ± 0,37 MBq de ^{18}F-FDG en la vena de la cola de los animales. Durante la administración de FDG y la adquisición de imágenes, las ratas se mantuvieron anestesiadas con 2,5-3% de isoflurano/oxígeno a través de una máscara facial y se monitoreó la respiración. Las adquisiciones estáticas PET/CT se realizaron 45 minutos después de la inyección intravenosa de ^{18}F-FDG, y consistieron en una exploración PET de 20 minutos seguida de una exploración CT de 20 minutos. Las imágenes PET se reconstruyeron utilizando el algoritmo de maximización de expectativas de máxima verosimilitud (MLEM) con 12 iteraciones y un tamaño de píxel de imagen de 0,5x0,5x0,5 mm^3, incluyendo decaimiento, dispersión, coincidencias aleatorias y sin corrección de atenuación. Los parámetros de adquisición de la adquisición CT fueron de 35 kV para una corriente de tubo de 200 μA con 250 proyecciones por lecho. Las imágenes reconstruidas tuvieron un tamaño de píxel de 0,5x0,5x0,5 mm3. El campo de visión (por sus siglas en ingles FOV) de las exploraciones PET y CT cubrió todo el cuerpo de los animales.

El análisis de imágenes se llevó a cabo utilizando la herramienta de análisis de datos de imágenes médicas de Amide (247) midiendo diferentes regiones de interés (ROI) elipsoidales de 5x5x5 mm (524 mm3) delimitando el área de señal en cada ojo. También se evaluaron el hígado, el bazo y la rodilla. La concentración media del radiotrazador derivada de las diferentes ROI se corrigió mediante la desintegración radiactiva del radioisótopo ^{18}F (vida media de 110 min). Las mediciones semicuantitativas de la absorción de ^{18}F-FDG se estimaron utilizando el valor de absorción estandarizado (SUV) siguiendo la Ecuación 1.

$$SUV = \frac{measured\ radioactivity\ concentration\ (Bq/mL)}{injected\ radioactivity\ (Bq)/bodyweight\ (g)}$$

Ecuación 1. Ecuación del valor de absorción estandarizado (SUV). Bq: becquerel.

Análisis estadístico

El análisis de los datos de las variables estudiadas se realizó mediante el software GraphPad Prism 9 para macOS v.9.3.1 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.).

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Antes del análisis se comprobó la normalidad de la distribución con la prueba de Shapiro-Wilk para cada parámetro estudiado. Para los resultados de la PIO, se realizaron dos análisis: análisis intragrupo e intergrupo. El análisis intragrupo se realizó para observar diferencias dentro de los grupos antes y después de la inducción o inyección intravítrea. Una vez aceptado el supuesto de normalidad y homogeneidad de la varianza, se realizó una prueba paramétrica ANOVA de 2 vías pareada con la prueba de comparaciones múltiples de Sidak. Posteriormente, para el análisis intergrupal se aplicó un ANOVA paramétrico de 2 vías no pareado con la prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

En la evaluación estadística de los valores de SUV adquiridos a partir de las exploraciones PET/CT, se aplicó un ANOVA unidireccional con la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Para todos los casos, se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando la comparación arrojó una α-valor $<0,05$.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Caracterización preclínica de un modelo de tauopatía con técnicas de OCT

Resumen gráfico:

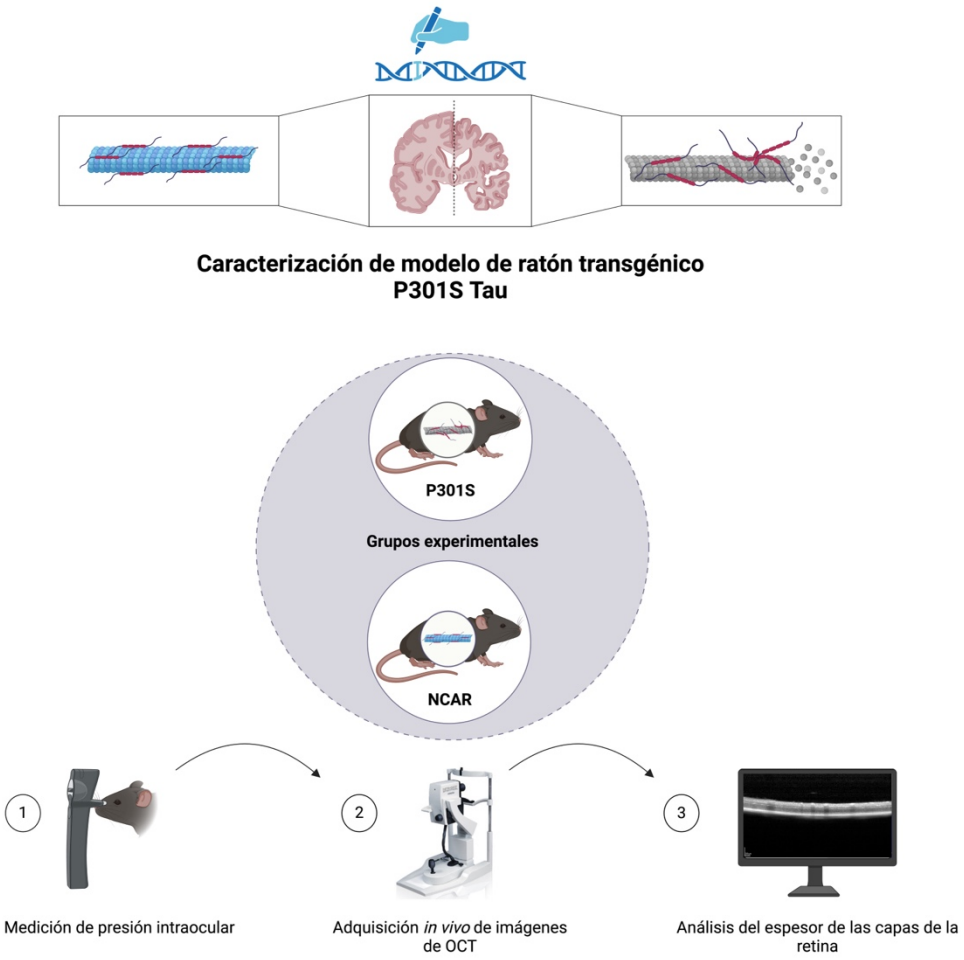


Figura 13. Resumen gráfico donde se observan el diseño del estudio realizado para la caracterización preclínica del modelo tauopatía con técnicas de OCT. NCAR: ratonas no portadoras del gen P301S; P301S: ratonas hemicigóticas modificadas genéticamente para expresar el gen humano P301S. Creado con BioRender.com.

Ratones transgénicos P301S Tau



Figura 14. Imagen del fenotipo de los ratones P301S obtenida del sitio web de https://www.jax.org/strain/008169.

Los ratones empleados en esta sección pertenecen a la línea de ratones transgénicos PS19 (Figura 14) (P301S Tg) (B6; C3-Tg (Prnp-MAPT*P301S) PS19Vle/J; Stock #008169). Se desarrollaron con el fin de que expresaran el gen mutante P301S de la proteína tau asociada a microtúbulos humanos (MAPT) (248).

En términos generales, desarrollan neuroinflamación con activación de la microglía y astrogliosis. A los 3 meses comienzan a desarrollar signos de deterioro cognitivo y muscular. La formación de ovillos neurofibrilares en la corteza, amígdala, hipocampo, troncoencéfalo y médula espinal se observa a los 5 meses de edad. Estos sucesos provocan una degradación sináptica significativa a los 6 meses de edad. A partir de ese momento, los ratones P301S sufren pérdida neuronal y atrofia cerebral en el hipocampo a los ocho meses. Finalmente, la esperanza de vida de este modelo animal es de aproximadamente de entre los nueve y los doce meses de edad (248).

Este fenotipado de neurodegeneración es similar al hallado en pacientes humanos con enfermedad de Alzheimer y tauopatía haciendo a este modelo óptimo para el estudio preclínico de dichas enfermedades.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Animales

Para la caracterización preclínica de la retina del modelo de tauopatía, se utilizaron un total de nueve ratones hembra: 6 ratonas hemicigóticas P301S (B6; C3-Tg (Prnp-MAPT*301S) PS19Vle/J; Stock #008169) y 3 ratonas NCAR (no portadoras de Tg (Prnp-MAPT*P301S) PS19Vle-Chr3). Todos los animales se obtuvieron de The Jackson Laboratory (Filadelfia, PA, EE. UU.).

Los procedimientos siguieron las normas españolas y de la Unión Europea (UE) (86/609/CEE, 2003/ 65/ CE, 2010/63/UE, RD 1201/2005, y RD53/2013) y fueron aprobados por el Comité Ético de Investigación del Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela (IDIS) 15011/2021/004. Los animales fueron tratados de acuerdo con la declaración ARVO para el uso de animales en investigación oftalmológica y de la visión, así como las guías aprobadas para animales de laboratorio (238,239). Se realizó un estudio longitudinal de las retinas de ambos grupos a las 12, 24, 36 y 48 semanas de edad y se controló el peso de los animales en todos los puntos temporales del estudio (un ratón P301S murió antes de finalizar el estudio, por lo que en el último punto temporal de 48 semanas sólo se analizaron 5 ratones P301S). En la figura 15 se muestra el diseño experimental del estudio. Los estudios de imagen se realizaron en el Centro de Investigación Animal de la Universidad de Santiago de Compostela (CEBEGA, Santiago de Compostela, España) y los animales se mantuvieron en jaulas bajo temperatura controlada (22±1 °C) y humedad (60±5%) y mantenidos en un ciclo día/noche (12/12h) con comida y agua *ad libitum*.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

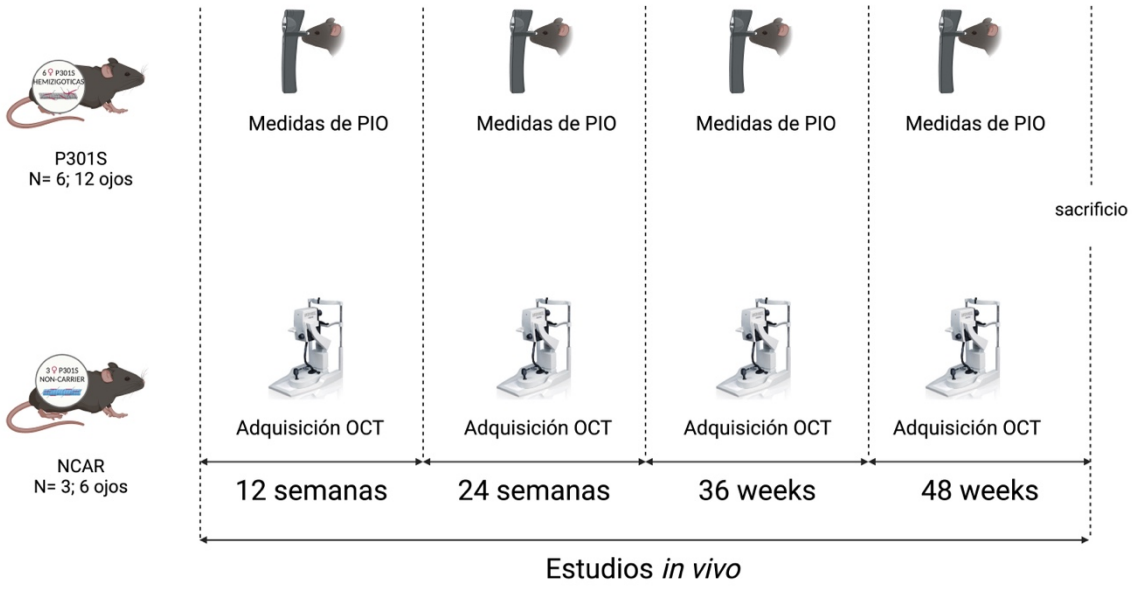


Figura 15. Diseño experimental del estudio longitudinal para los diferentes tiempos analizados. NCAR: ratonas no portadoras del gen P301S; OCT: tomografía de coherencia óptica; PIO: presión intraocular; P301S: ratonas hemicigóticas modificados genéticamente para expresar el gen humano P301S. Creado con Biorender.com.

Medida de la presión intraocular

Para las mediciones de la PIO, los animales se anestesiaron previamente en una cámara de gas veterinaria con un 3,0% de isoflurano/oxígeno. Una vez los ratones estaban completamente anestesiados, se les colocó en una superficie plana en posición decúbito prono con una máscara fácil que proporcionaba anestesia continua a un flujo de 2,5% (v/v%) de isoflurano/oxígeno. Se midió la PIO en ambos ojos por triplicado con un tonómetro de rebote para roedores previamente calibrado para ratón (iCare TonoLab, Icare, Finlandia, Oy).

Estudio por imagen de tomografía de coherencia óptica (OCT)

Tras las mediciones de la PIO, se evaluó la presencia de zonas con hipo o hiperreflectividad anómalas en el fondo de ojo y se realizó un análisis cualitativo de las imágenes. Se realizaron dos análisis comparativos, donde se compararon los hallazgos longitudinalmente encontrados dentro del mismo grupo para

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

posteriormente compararlos con el grupo control con el fin de caracterizar los cambios encontrados.

Posteriormente se realizó el estudio estructural de la retina mediante adquisiciones de imágenes OCT. El instrumento utilizado para el estudio OCT de la retina fue un SD-OCT (SPECTRALIS® OCT, Heidelberg Engineering, Alemania), un tomógrafo de coherencia óptica que proporciona una imagen de fondo de ojo y cortes tomográficos estructurales gracias a la combinación de la imagen IR (longitud de onda del láser: 815 nm), con la imagen OCT-cSLO (longitud de onda del SLD: 840 nm). La velocidad de adquisición de los A-Scan es de 40 kHz/85 kHz para la imagen de IR y OCT-cSLO respectivamente. Para la adaptación del instrumento al globo ocular del ratón, se modificaron los puntos de referencia axial del software clínico y se acopló al objetivo de 30° una lente de +90 D.

Durante la preparación de los animales y con el fin de obtener una penetración completa de la luz y una buena evaluación del segmento posterior, se administró en cada ojo una gota de colirio midriático (10 mg/ml de clorhidrato de ciclopentolato; Colirofta® Ciclopléjico, Alcon Healthcare, Texas, EE. UU.). Una vez confirmada la dilatación pupilar, se colocó una lente de contacto rígida gas permeable (Figura 16) (curva base: 1,70 mm; diámetro: 3,20 mm; potencia: 0D; Cantor & Nissel Ltd, Market Place, Northamptonshire, Reino Unido) con una gota de lagrima artificial (3 mg/ml de hipromelosa y 5,5 mg/ml de cloruro de sodio; ACUOLENS®, Alcon Healthcare , Texas, EE. UU.) para hidratar y evitar las irregularidades corneales causadas por la sequedad ocular.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



Figura 16. Lente de contacto rígida gas permeable empleada en el estudio de la retina de ratones para la caracterización del modelo de tauopatía. A la izquierda se encuentra la lente de contacto colocada en el dedo donde se puede comparar el tamaño con el dedo humano. A la derecha se encuentra el lentillero donde se guardan las lentillas una vez acaba la adquisición y los parámetros de esta.

Tras la preparación de los animales, se colocaron en el sistema Spectralis® OCT en posición decúbito prono en una plataforma plana con una manta eléctrica calefactora a 38 °C para evitar la hipotermia causada por la anestesia (234). Para favorecer la máxima calidad de imagen, el animal se posicionó en la plataforma en la parte contraria al ojo evaluado, con el ojo en perpendicular a la lente del objetivo.

Se realizaron adquisiciones OCT volumétricas en un campo de visión central de 30° utilizando un protocolo personalizado de 73 B-scan con una distancia entre ellos de 60 µm centrados en el nervio óptico. La resolución utilizada para cada análisis de espesor retiniano fue de 4,80 x 3,87 µm/píxel analizando un total de 1024 x 496 píxeles por imagen. Se utilizó el software de seguimiento ocular (TruTrack, Heidelberg Engineering, Alemania) para asegurar la misma área retiniana en cada escaneo de los puntos temporales. Se obtuvieron valores de espesor retiniano total, capa de fibras nerviosas de la retina en la zona peripapilar (pRFNL), capa de células ganglionares (CCG), capa plexiforme interna (CPI), capa nuclear interna (CNI), capa plexiforme externa (CPE), capa nuclear externa (CNE) y epitelio pigmentario de la retina (EPR) (Figura 17). La medición de la pRNFL se realizó en la zona peripapilar con un protocolo circular centrado en el nervio óptico.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

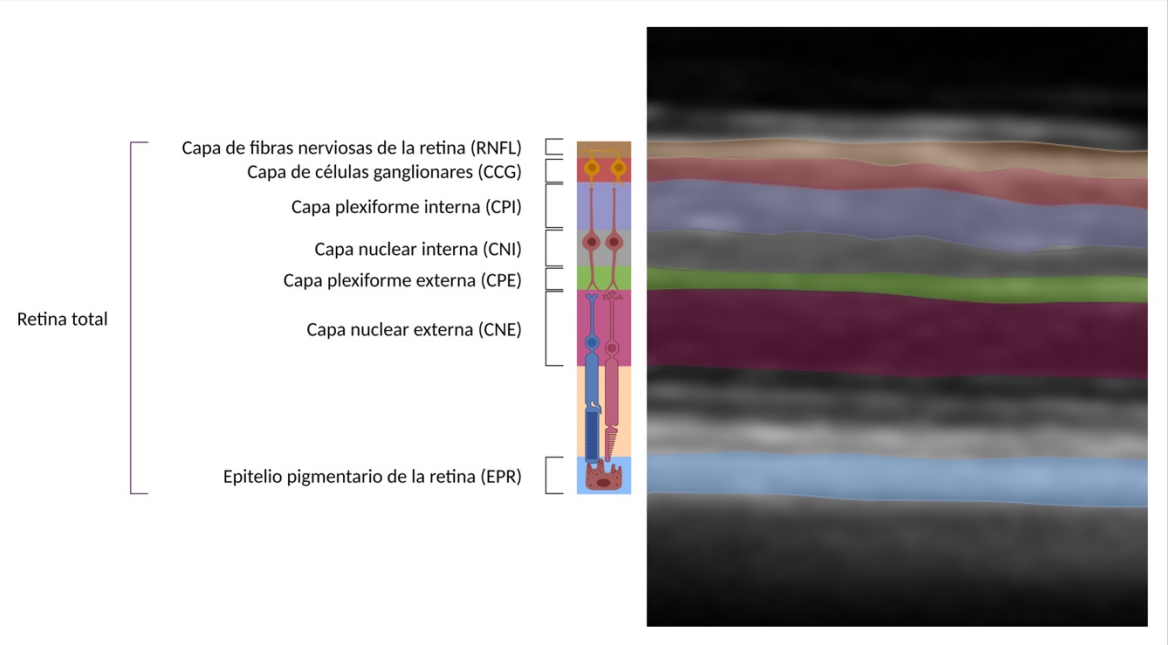


Figura 17. Imagen representativa de la segmentación de las capas de la retina analizadas y disposición de las células de la retina.

Después de la adquisición de imágenes, las capas retinianas fueron segmentadas por el propio software del instrumento. Para el análisis del espesor retiniano de CCG, CPI, CNI, CPE, CNE y EPR se analizaron 8 sectores pertenecientes al círculo ETDR de 1, 2, 3 mm: superior interno (S1); superior externo (S2); inferior interno (I1); inferior externo (I2); nasal interno (N1); nasal externo (N2); temporal interno (T1); temporal externo (T2) (figura 18a). Los parámetros registrados para el análisis de la pRNFL fueron el grosor medio de seis sectores del disco: superonasal (SN), nasal (N), inferonasal (IN), inferotemporal (IT), temporal (T) y superotemporal (ST) (Figura 18c).

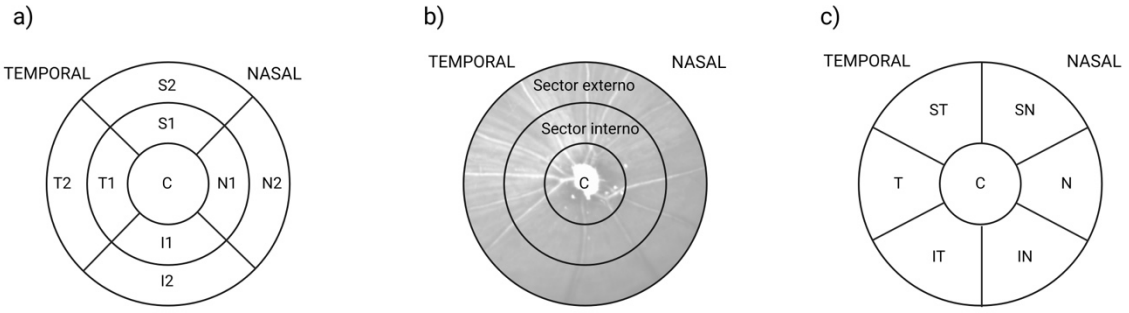


Figura 18. Imágenes representativas de los sectores empleados en el análisis del espesor retiniano de las diferentes capas estudiadas. a) Sectores del círculo ETDR de 3, 2, 1, mm de tamaño. b) Imagen representativa del círculo ETDR centrado en el nervio óptico mostrando los sectores centrales, internos y externos. c) Sectores analizados en el protocolo circular empleado para analizar la capa pRNFL. I1: inferior interno; I2: inferior externo; IN: inferonasal,

IT: inferotemporal; N1: nasal interno; N2: nasal externo; N: nasal; S1: superior interno; S2: superior externo; SN: superonasal; ST: superotemporal; T1: temporal interno; T2: temporal externo; T: temporal.

Análisis estadístico

El análisis estadístico de las variables estudiadas se realizó mediante Graphpad Prims 9 para macOS v.9.3.1 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.). Se verificó la distribución de normalidad con el test de Shaphiro-Wilk para los parámetros estudiados. Los cambios en el grosor de la retina dentro de los grupos y entre ellos se analizaron con un modelo de efectos mixtos. Se realizó una comparación múltiple en el análisis intragrupo mediante una prueba de comparaciones múltiples de Tukey, mientras que para el análisis intergrupo se realizó una prueba de comparaciones múltiples de Sidak. Para los resultados de la PIO, se realizó un análisis intergrupo entre grupos y un estudio intragrupo para observar las diferencias dentro de los puntos temporales estudiados.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

RESULTADOS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

RESULTADOS

Caracterización preclínica de un modelo de uveítis por inducción de endotoxina usando OCT, PET/CT y proteómica

Análisis de la presión intraocular en ratas de modelo EIU

Se realizó un primer análisis comparativo intragrupo para estudiar las variaciones dentro de un mismo grupo en los tiempos evaluados (Figura 19A). Así, se observó un aumento significativo de la presión intraocular en ratas inducidas con LPS por vía intravítrea (LPSi) (Sidak; $\alpha<0,05$), mientras que se produjo una disminución significativa en ratas inducidas sistémicamente por LPS (LPSs) (Sidak; $\alpha<0,01$) (Figura 18A). También se realizó una comparación entre los grupos inducidos y el grupo de control sano para identificar diferencias en la PIO donde se encontró un aumento significativo en las mediciones postinducción para el modelo LPSi en comparación con el grupo control y entre los grupos de uveítis (Tukey, $\alpha<0,01$). No se encontraron diferencias significativas entre la inyección intravítrea de BSS y el grupo de control sano (Tukey, α n. s) (Figura 19B).

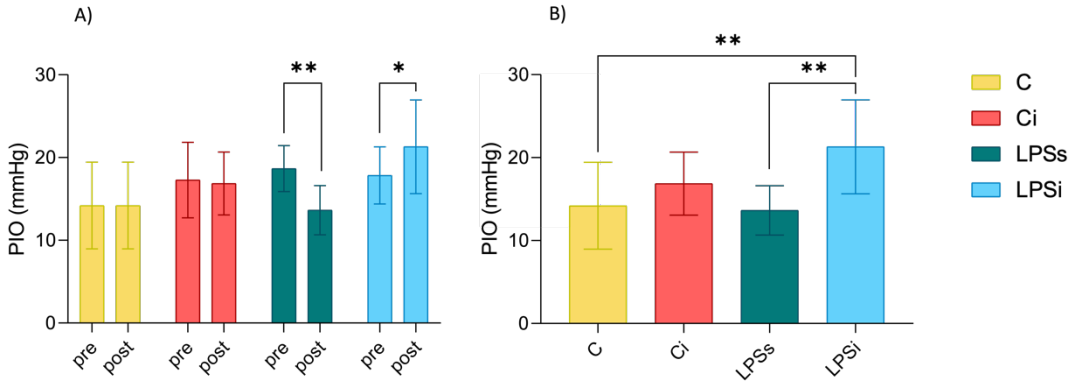


Figura 19. Variaciones de la presión intraocular medidas en diferentes momentos temporales en los diferentes grupos analizados. A) Análisis comparativo pareado intragrupo de la presión intraocular (prueba de comparaciones múltiples de Sidak). Pre: antes de la inducción; Post: 24 horas después de la inducción. B) Análisis comparativo no apareado entre grupos de la presión intraocular (prueba de comparaciones múltiples de Tukey); *: significancia estadísticaα<0,05; **: significancia estadísticaα<0,01.

Estudio por imagen OCT de la cámara anterior de ratas de modelo EIU

El AS-OCT permitió el examen de la cámara anterior, observando cambios estructurales debido a la inducción de uveítis por las dos vías de administración de LPS, proporcionando información sobre la inflamación subyacente en ambos modelos. Los hallazgos observados en las imágenes de los animales con procedimientos oculares se compararon con imágenes obtenidas de ojos de control sanos (Figura 19). Se eliminaron las imágenes correspondientes a párpados o piel y sin imagen clara de la cámara anterior.

Como se puede ver en la Figura 20A, el segmento anterior del grupo de control sano (C) no mostró signos de inflamación como infiltrado celular, membranas fibróticas o inflamación del iris. La cámara anterior muestra una imagen hiporreflectante y unas estructuras oculares sanas. En el análisis de los hallazgos del grupo Ci se encontraron signos de infiltrado celular en todos los animales (100%), siendo más prevalente en la región central. En el resto de los signos inflamatorios evaluados, sólo el 10% presentó membranas fibróticas, y el 20% sufrió inflamación del iris en las regiones central, media superior y superior (Figura 20B).

En el grupo de LPS (Figura 20C), como signo destacable de inflamación, se observó que el 80% de los animales presentaban infiltrado celular en al menos una de las cinco regiones analizadas y el 20% padecía inflamación del iris. No se observaron signos de membranas fibróticas en ningún animal inducido sistémicamente. En el grupo LPSi (Figura 20D) se presentaron signos de infiltrado celular en el 100% de los animales en todas las regiones, siendo la región central y media superior las que presentaron mayor infiltrado celular. Se encontraron membranas fibróticas e inflamación del iris en el 60% de los animales.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

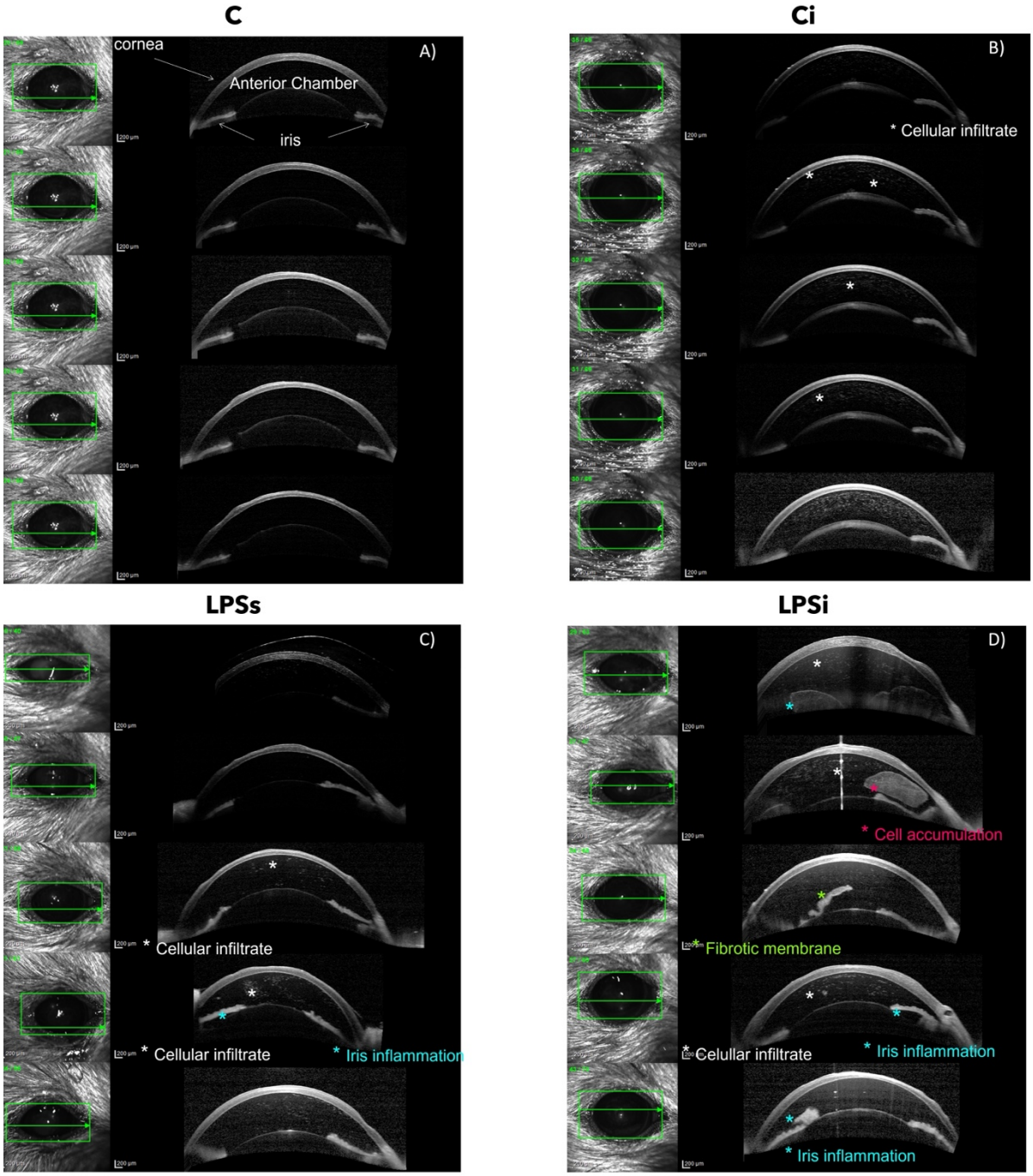


Figura 20. Imágenes in vivo de la cámara anterior del ojo de rata. A) Sección media inferior de la cámara anterior de una rata control sana sin hallazgos inflamatorios relevantes. B) Sección media de la cámara anterior de ratas a las que se les administró BSS por vía intravítrea 24 horas después de la administración. C) Sección media baja de ratas inducidas con LPS sistémico 24 horas después de la administración. D) Sección media de la cámara anterior de ratas inducidas con LPS intravítreo 24 horas después de la administración. *blanco: infiltrado celular; *magenta: acumulación de células; *verde: membrana fibrótica; *azul: inflamación del iris.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tras la comparación cualitativa de los signos más destacados entre los grupos Ci y LPSi, se observó que la hiperreflectancia de la cámara anterior de los animales del grupo LPSi fue mayor que la observada en el grupo Ci, producida por el gran número de células localizadas en la cámara anterior de dicho grupo. En algunos casos, la gran presencia de infiltrado celular provocó aglomeramiento y en consecuencia masas celulares. En la comparación entre las señales inflamatorias del modelo LPSs y el modelo LPSi se observó el mismo comportamiento que en la comparación anterior, la hiperreflectancia observada en la cámara anterior del grupo LPSi fue mayor que la encontrada en el grupo LPSs. Además, el modelo LPSi produjo mayores signos inflamatorios en la cámara anterior. Finalmente, cabe destacar que la exploración del segmento posterior y de la retina no se pudo realizar debido a la turbidez de los medios en la cámara anterior, como demuestran las imágenes AS-OCT, como en la cámara posterior. La presencia de turbidez en los medios oculares impidió el correcto funcionamiento físico del instrumento y por lo tanto no fue posible obtener imágenes confiables y claras del segmento posterior.

Análisis proteómico de tejido ocular de ratas EIU

Se realizó un análisis cuantitativo de las proteínas moduladas entre los grupos examinados. El análisis del proteoma y la comparación se pueden encontrar en el repositorio MassIVE. Se realizó una comparación entre modelos de uveítis (LPSi vs LPS); grupo de control sano y modelo LPSi (C vs LPSi); grupo de control sano y modelo LPS (C vs LPS) y grupo Ci y modelo LPSi (Ci vs LPSi). Como criterios de análisis se estudiaron aquellas proteínas que se expresaron estadísticamente de manera significativa ($\alpha<0,05$) y con un 'fold change' o relación de expresión génica (FC) por debajo de 0,5 y hasta 2. En la Figura 21 se encuentra código QR donde se recoge el análisis proteómico de la comparativa entre grupos.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Figura 21. Análisis proteómico de la comparación entre los grupos de EIU analizados (código QR).

En la comparación LPSi vs LPS se cuantificaron un total de 355 proteínas de las cuales 28 tienen una modulación estadísticamente significativa (α<0,05) y tienen relación FC elegida. De las 28 proteínas expresadas diferencialmente (DEP), 20 de ellas se sobreexpresan al menos 2 veces en el modelo LPSi. La Figura 22a muestra un gráfico de volcán de las proteínas moduladas en la comparación entre LPSi y LPSs. De las 20 proteínas reguladas positivamente en el grupo LPSi, se encontró un aumento en la proteína *S100A9* (FC=5,28; α<0,05); *Homólogo de la proteína 7 de la enfermedad de Parkinson* (FC = 4,76; α<0,05); *Catepsina G* (FC=4,59; α<0,001); *Proteína inyectada con calor HSP 90-alfa* (FC = 3,70;α<0,05) y *proteína mitocondrial Stress-70* (FC=2,33; α<0,01) entre otros.

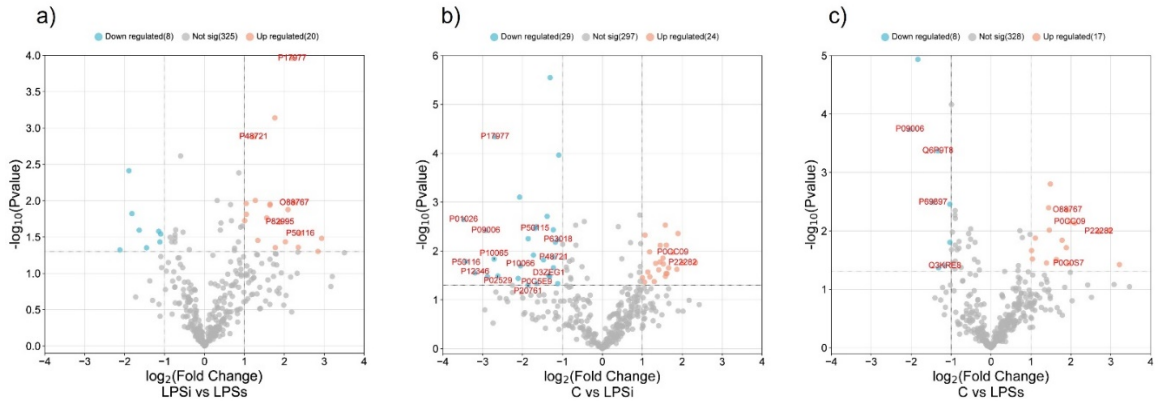


Figura 22. 'Volcano plot' de las proteínas modulaas en las diferentes comparaciones realizadas. a) LPSi vs LPSs; b) C vs LPSi; c) C vs LPSs.

Se llevó a cabo un análisis de red de las proteínas reguladas positivamente. Algunos de los procesos biológicos más representativos en los que estuvieron involucradas estas proteínas incluyen la respuesta inmune humoral, regulación positiva de la respuesta de defensa, respuesta a sustancias tóxicas, respuesta inflamatoria y respuesta a lípidos (Figura 23).

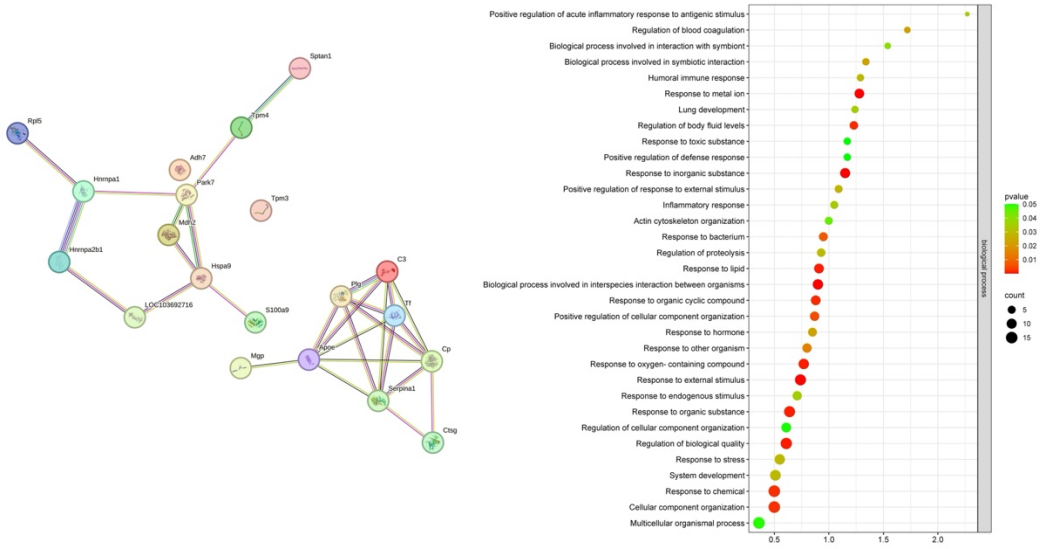


Figura 23. Análisis de ontología genética y de redes de la comparación LPSi vs LPSs.

En el análisis entre el grupo de control sano y el modelo LPSi (C vs LPSi), se encontraron 29 proteínas reguladas positivamente al menos 2 veces en el modelo LPSi en comparación con el grupo de control sano (Figura 22b). Ejemplos de DEPs son el *choque térmico afín 71* (FC = 0,46; α<0,01), *proteína Stress 70* (FC=0,43; α<0,05), *cristalina gamma N* (FC=0,39; α<0,05), *gamma cristalina S* (FC=0,32; α<0,05), *cristalina B gamma* (FC=0,24; α<0,05), *cristalina gamma C* (FC=0,16; α<0,05), *proteína S100-A8* (FC=0,31; α<0,01), *cadena de Ig gamma-2B* (FC=0,28; α<0,05), *catepsina G* (FC=0,16; α<0,001), *inhibición de la serina proteasa* (FC=0,13; α<0,01), *serotransferrina* (FC=0,11; α<0,05), *proteína S100-A9* (FC=0,09; α<0,05), *complemento C3* (FC=0,09; α<0,01), entre otras. Como lo reveló el análisis de redes, se encontraron diferentes procesos biológicos significativamente alterados, como la agregación de neutrófilos, la remodelación de partículas de lipoproteínas de muy baja densidad, la regulación de la transducción de señales de la proteína Cdc42, la remodelación de partículas de lipoproteínas de alta densidad, la respuesta inflamatoria aguda, la respuesta inmune humoral, la respuesta a herida, cicatrización de heridas, regulación de la respuesta inflamatoria, respuesta

inflamatoria, respuesta inmune innata y regulación de la respuesta inmune, entre otros (Figura 24). Al comparar el modelo Ci y LPSi (Ci vs LPSi) se encontraron 24 DEPs. Se analizaron las DEP superpuestas después de cruzar los resultados de C vs LPSi y Ci vs LPSi. Las proteínas LPSi reguladas positivamente presentes en ambas comparaciones fueron *catepsina G* (FC=0,25; α<0,001), *Proteína S100-A8* (FC=0,24; α<0,001), *inhibidor de serina proteasa A3N* (FC=0,26; α<0,001) y *Complemento C3* (FC=0,21; α<0,05).

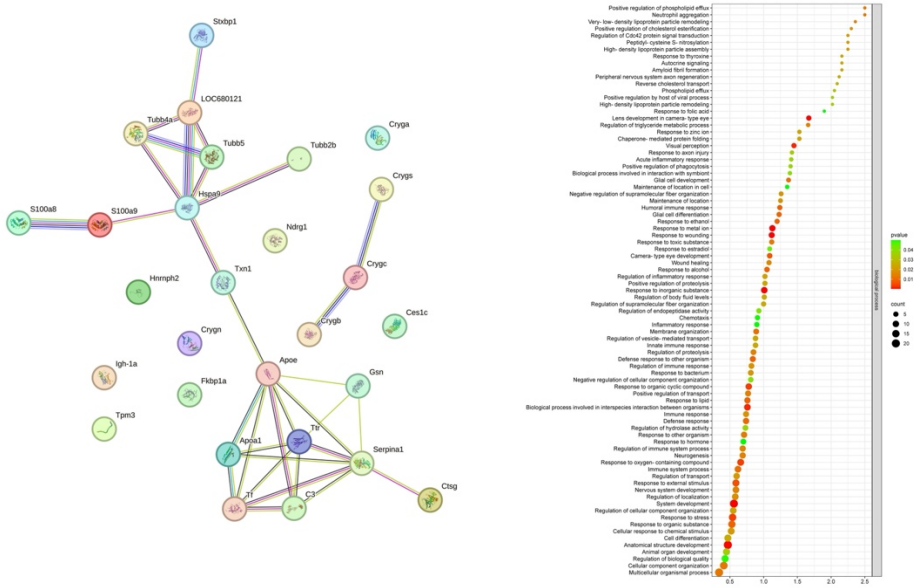


Figura 24. Análisis de ontología genética y de redes de la comparación C vs LPSi.

Al comparar el grupo de control sano con el grupo de LPS (C frente a LPS), solo 8 proteínas aumentaron significativamente y estuvieron dentro de la proporción elegida en el grupo de LPS (Figura 22c). El *Complemento C3* (FC= 0,28; α<0,001) y la proteína *inhibidora de serina proteasa* (FC=0,25; α<0,001) se encontraron entre las proteínas reguladas positivamente.

Estudio por imagen PET/CT del globo ocular y órganos de ratas de modelo EIU

Se analizó individualmente la captación de ^{18}F-FDG de cada órgano seleccionado y se realizó un análisis comparativo múltiple entre los resultados obtenidos en ratas control sanas y las inyectadas con LPS por vía sistémica e intravítrea. En la figura 25 se muestra la captación ocular de las imágenes PET/CT con ^{18}F-FDG en los diferentes

grupos. Las elipses rojas en la imagen representan las regiones de interés de los ojos. En esta primera evaluación cualitativa se observa claramente una mayor captación de ^{18}F-FDG en el cerebro del grupo FDG-LPSi respecto a los otros dos grupos, a su vez, la captación del grupo FDG-LPSs es mayor que la del grupo FDG-C. Además, en el grupo de FDG-LPSs se observó una mayor captación ósea y articular.

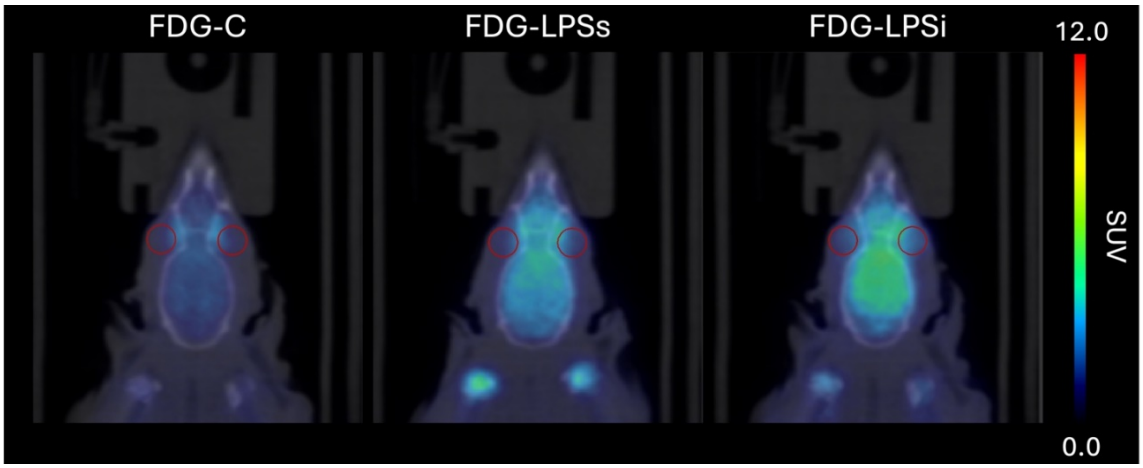


Figura 25. Imágenes coronales fusionadas de PET/CT de cabezas de ratas para los grupos escaneados. La escala de colores representó la absorción de 18F-FDG desde una intensidad más baja (azul) hasta una más alta (rojo). FDG-C: grupo control sano; FDG-LPSi: grupo EIU intravítreo; FDG-LPSs: grupo EIU sistémico; SUV: valor de absorción estandarizado.

Como se muestra en la Figura 26, se observó una diferencia significativa entre las ratas de control sanas y los modelos de uveítis inducida para el análisis de la región ocular. Ambos modelos de uveítis dieron valores de SUV oculares significativamente más altos que las ratas control (Tukey, α<0,0001). En la comparación entre ratas inducidas por LPSi y LPSs, la absorción de ^{18}F-FDG en el grupo de LPSi es significativamente mayor que en el grupo de LPSs (Tukey, α<0,05).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

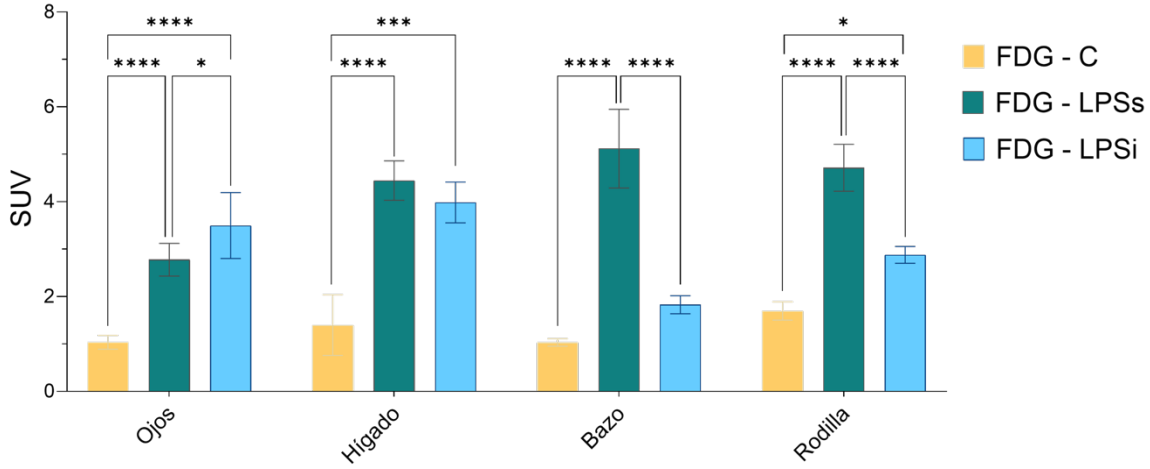


Figura 26. Valores de SUV y desviación estándar de los órganos evaluados en los diferentes modelos realizados y su comparación entre grupos. FDG-C: grupo control sano; FDG-LPSi: grupo EIU intravítreo; FDG-LPSs: grupo EIU sistémico; SUV: valor de absorción estandarizado; *:α<0,05; ***:α<0,001 y ****:α<0,0001.

Se evaluó la captación sistémica de ^{18}F-FDG en diferentes regiones. Como se puede observar en la figura 26, hubo una captación notable en el hígado, bazo y rodilla. En el análisis comparativo entre el grupo de control sano y los grupos inducidos, se encontró un SUV significativamente mayor en el hígado de los modelos inducidos en comparación con la rata de control sana (Tukey, $\alpha_{intravítreo}$<0,001; $\alpha_{sistémico}$<0,0001). También se encontraron diferencias significativas en la captación entre el modelo inducido intravítreo y sistémico en el bazo, siendo el SUV mayor en el modelo sistémico (Tukey, α<0,0001).

La rodilla fue otra región donde se observó una mayor captación. En esta área, las ratas con uveítis dieron valores de SUV significativamente más altos que las ratas control sanas. Nuevamente, hubo diferencias significativas entre los animales inducidos por vía sistémica e intravítrea. El grupo sistémico dio valores de SUV significativamente más altos que el grupo intravítreo (Tukey, α<0,0001). Como se puede observar en la Figura 25, la captación de ^{18}F-FDG en el cerebro es mayor en los grupos modelo de uveítis, y entre ellos, el grupo de FDG-LPSi es el que tiene mayor captación.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Discusión

En esta sección de la presente Tesis Doctoral se analizaron y caracterizaron dos modelos de uveítis con técnicas de imagen novedosas y no invasivas. Además, se realizó un estudio proteómico para correlacionar los hallazgos de las imágenes con la presencia de determinadas proteínas moduladoras de la inflamación. La inducción del modelo de uveítis se realizó mediante la administración de una endotoxina por dos vías diferentes con el fin de simular una uveítis idiopática y una uveítis derivada de una inflamación sistémica (216). En primer lugar, se considera la vía sistémica por ser la que tradicionalmente se ha utilizado para inducir modelos de uveítis. Esto implica un curso rápido y corto de uveítis anterior (61) debido al privilegiado y único sistema inmunológico del globo ocular (249,250). Cuando el LPS se administra por vía sistémica, el lipopolisacárido rompe las barreras sanguíneas y desencadena la activación del sistema inmunológico. En ese momento, las células inmunes inician la migración al segmento anterior del ojo y a otras estructuras (249). Este fenómeno permite utilizar la administración sistémica de LPS para evaluar procesos oculares y otros procesos inflamatorios como la neuroinflamación (218,219) o la sepsis por dismotilidad gastrointestinal (220) debido su manipulación y reproducibilidad (251). Es por ello que la administración sistémica de LPS puede inducir mecanismos inflamatorios sistémicos que enmascararían o dificultarían la evaluación ocular (252,253). Debido a esto, cada vez son más los estudios que optan por la administración intravítrea de LPS frente a la sistémica (221,251). Aunque estos modelos no provocan todos los signos oculares de la uveítis clínica (254), parece que la inflamación inducida debería ser sólo local y por tanto más apropiada para un modelo de uveítis. Esta es la razón por la que la administración intravítrea se considera como modelo de inducción para estudiar la uveítis anterior aguda y podría ser el modelo más adecuado para evaluar la eficacia de los fármacos oculares, ya que presenta niveles elevados de citocinas proinflamatorias en los fluidos oculares (255). A pesar del intenso trabajo para generar modelos óptimos de uveítis, ha habido pocos avances en el desarrollo de biomarcadores no invasivos. Hoy en día, existe un interés creciente en técnicas menos invasivas para la evaluación y caracterización de la uveítis, principalmente debido a la necesidad de mejorar la caracterización in vivo de los modelos actuales y, en última instancia, de una mejor comprensión del comportamiento de la uveítis. Además, se requieren alternativas más éticas en la investigación preclínica, debido a las limitaciones cada vez más estrictas en el uso de animales para experimentación. Los estudios de imagen implementados en este trabajo tienen un impacto directo en las

USC DE COMPOSTELA

implicaciones de las 3R, ya que el número de animales se reduce exponencialmente al no tener que sacrificar cada animal para medir los parámetros estudiados. Respecto a esto, el presente estudio proporciona una caracterización completa de modelos de uveítis inducida por la administración sistémica e intravítrea de LPS utilizando marcadores de imágenes *in vivo* basados en estudios OCT y PET/CT. Además, los hallazgos de las imágenes se correlacionaron con un extenso estudio proteómico, que permitió la caracterización molecular previa de los modelos en términos de proteínas moduladoras de la inflamación.

La PIO alta aumenta la probabilidad de daño axonal y, en consecuencia, de glaucoma. Con el paso de los años, la necesidad de estudiar la PIO en pacientes con uveítis ha ido aumentando debido a su asociación (256–258). En este trabajo, al estudiar las variaciones de la PIO, se observa que la inyección intravítrea de LPS provoca un aumento significativo que no se observa en el modelo sistémico. Este hallazgo podría deberse al aumento inmediato debido a la propia inyección observado en diferentes estudios (259,260). En consecuencia, el aumento de la PIO del modelo inducido por inyección intravítrea podría deberse a la influencia combinada entre el proceso inflamatorio ocular grave y el efecto de la propia inyección intravítrea. Sole *et al*. Informó en un estudio sobre uveítis por inyección intravítrea en gatos un aumento de la PIO después de la inyección de solución salina estéril (261). En este sentido, las diferencias encontradas entre el estudio de Sole *et al*. y el nuestro pueden deberse a posibles diferencias en la respuesta inmune entre gatos y ratas. Nuestra hipótesis es que la inflamación provocada por la inyección de LPS provoca un cambio continuo en la PIO, ya que tampoco se encontraron diferencias entre la inyección de BSS y los animales control. En cuanto a los estudios AS-OCT, el uso de esta técnica de imagen proporcionó información no invasiva sobre cortes morfológicos de la cámara anterior de los animales. Esto nos permitió detectar signos clínicos de infiltrado celular, membrana fibrótica e inflamación del iris en animales inducidos con LPS tanto intravítreo como sistémico, resultados que se corresponden con los encontrados en otros estudios preclínicos de la enfermedad (262–265). No se pudieron obtener imágenes de fondo de ojo y OCT de retina debido a la inflamación subyacente y la turbidez en la cámara posterior, especialmente en el grupo inducido por vía intravítrea. Este evento también se observó en otros estudios que confirman la presencia de opacidad de los medios oculares (266). Además, se observó que la inyección intravítrea de BSS producía signos claros de inflamación intraocular. Estos hallazgos son consistentes con informes clínicos previos de posible inflamación

USC DE COMPOSTELA

subclínica en la cámara anterior después de la inyección (261). Finalmente, se ha confirmado que la administración intravítrea de LPS activa eficazmente la respuesta inflamatoria celular, conduciendo a una mayor producción y liberación de células proinflamatorias, tal y como describen Gupta *et al.* (252).

Nuestro estudio describe el perfil proteómico obtenido en los diferentes modelos. Se demostró la presencia de histonas, proteínas cristalinas y S100A9 en los modelos de uveítis, con mayor expresión cuando se administra LPS por vía intravítrea. Además, se ha demostrado que la presencia de S100A8, proteína que se ha descrito como específica en varios modelos animales de uveítis, y proteínas proinflamatorias como la catepsina G, el inhibidor de la serina proteasa A3N y las proteínas del complemento C3 en el ojo están relacionadas con la presencia de LPS. Entre las proteínas proinflamatorias establecidas en los modelos de uveítis, el homólogo de la proteína 7 de la enfermedad de Parkinson estaba más regulado en el modelo intravítreo, aunque se encontró en ambos modelos de EIU. Esta proteína tiene una función protectora frente al estrés oxidativo y mediadora de la inflamación por el receptor TLR4 (267). Estos resultados ya han sido previamente descritos en la literatura, donde la presencia de beta-B2-cristalina (214), αA-cristalina (215), proteína S100A8 y S100A9 (196) también fueron detectados. También hay estudios en humor acuoso que demuestran niveles elevados de calprotectina y apolipoproteína E en modelos de inflamación, así como de beta-B2-cristalina (216). Zhang *et al.* identificó histonas como H1, H2A y H2B en el pico de la enfermedad. Concluyeron que la presencia de histonas en la retina de los animales podría tener un efecto protector contra el LPS (216).

Tras establecer la caracterización proteómica de los modelos y confirmando la asociación entre la administración de LPS y la inflamación ocular, se realizaron estudios PET/TC con ^{18}F-FDG. Hasta la fecha, este es el primer estudio que utiliza PET/CT para caracterizar la inflamación de modelos EIU. Los resultados de PET/CT son acordes con los obtenidos en AS-OCT y estudios proteómicos. El modelo de uveítis inducida mediante inyección intravítrea genera una mayor inflamación ocular en comparación con el modelo inducido sistemáticamente. Según los resultados, los análisis realizados en hígado, bazo y rodilla muestran que la captación de ^{18}F-FDG es mayor cuando se administra LPS por vía sistémica, confirmando una mayor afectación de estos órganos. En conclusión, la inflamación provocada en el modelo sistémico es más generalizada que la obtenida tras la administración local de LPS. Esta técnica de imagen también fue utilizada por Fujii *et al.* para evaluar la respuesta del linfoma

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ocular anexial al tratamiento (268) y por Bazewicz *et al.* en el estudio de niños con uveítis (168). Los roedores, a diferencia de los humanos, tienen una glándula en la cabeza, llamada glándula de Harder, que capta una gran cantidad de ^{18}F-FDG. Esta estructura está situada muy cerca del ojo de las ratas, por lo que se debe tener especial cuidado para garantizar que los datos de captación del ojo sean independientes de la captación de la glándula y no se vean afectados por ella. Por esta razón, al realizar el análisis de imágenes y colocar los ROI oculares se verificó que los datos del ojo no estuvieran influenciados por la captación de la glándula de Harder. La retina ha sido descrita como una ventana al cerebro debido a que los axones que componen el nervio óptico están conectados directamente al cerebro. Esto convierte al nervio óptico en una vía de transporte hacia el líquido cefalorraquídeo (269). Cuando se administra LPS, se rompen las barreras hematooculares y se activa la cascada inflamatoria que conduce a la proliferación de citoquinas y la activación de la microglía (270,271). Estos eventos pueden explicar el aumento de la captación de 18F-FDG en el cerebro de animales a los que se les administró LPS por vía intravítrea.

Entre las limitaciones de nuestro estudio está la evaluación subjetiva de las imágenes OCT. Existen estudios que proponen algoritmos de valoración objetiva para la evaluación de la cámara anterior (272). En la práctica clínica, uno de los signos que se comprueba es el posible edema corneal. En nuestro caso no se pudo evaluar porque el software Spectralis OCT de que disponemos no presenta una segmentación automática de la córnea. Debido a la medición manual del edema corneal, su posible error en la precisión de la medición y el hecho de que el espesor corneal es el signo menos confiable de inflamación, se decidió no realizarla. Otra limitación de la PIO y la OCT es la duración de la anestesia. Los estudios han demostrado que la anestesia prolongada puede provocar opacidades y sequedad ocular (273). A pesar de la instilación de lágrimas artificiales, se observan cambios en la fase de imagen, probablemente debidos a la anestesia. Aunque los estudios realizados demuestran la utilidad de la OCT para observar cambios en la inflamación del modelo animal y la correlación entre los ensayos probados, sería interesante objetivar los resultados de la OCT con estudios histológicos.

Los resultados de cada estudio en este trabajo son consistentes entre sí. La alta presencia de proteínas pertenecientes a las células que desempeñan un papel clave en el proceso inflamatorio obtenidas en el estudio proteómico se corresponde con los resultados obtenidos en las imágenes OCT y PET/CT, donde se observa un aumento

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

de la infiltración celular y de la inflamación del iris, y una mayor captación de ^{18}F-FDG causada por la inflamación, respectivamente. Teniendo en cuenta que el grado de inflamación de mayor a menor de los grupos estudiados es LPSi, LPSs y sano, es posible correlacionar el nivel de expresión de las proteínas obtenidas por proteómica con la aparición de signos a través de OCT y el nivel de captación de ^{18}F-FDG en el estudio PET/CT.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Caracterización preclínica de un modelo de tauopatía con técnicas de OCT

Análisis de la presión intraocular en ratones P301S

Se observó una disminución de la PIO en los ratones P301S en comparación con el grupo NCAR a las 12, 36 y 48 semanas de edad (Figura 27), sin embargo, el análisis entre grupos de la PIO no mostró diferencias significativas (α n. s). A las 24 semanas de edad, se observó un aumento en P301S en comparación con los ratones NCAR.

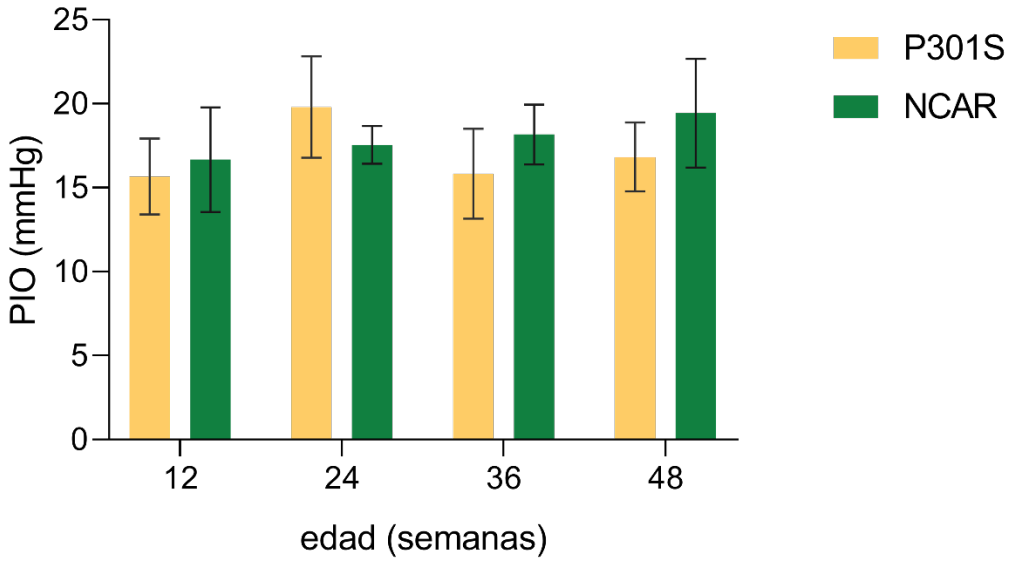


Figura 27. Comparativa longitudinal entre grupos de la presión intraocular a 12, 24, 36, 48 semanas de edad. NCAR: ratonas no portadoras del gen P301S; PIO: presión intraocular; P301S: ratonas hemicigóticas modificadas genéticamente para expresar el gen humano P301S.

La comparación intragrupo de la PIO medida en los ratones P301S en los momentos evaluados mostró un aumento a las 24 semanas de edad, seguido de una disminución de la medición de la PIO (Figura 28). Se encontró un comportamiento diferente en la comparación NCAR, en la que la PIO se mantuvo más estable a lo largo del tiempo (Figura 28). A pesar de esta tendencia, no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los análisis realizados (α n. s).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

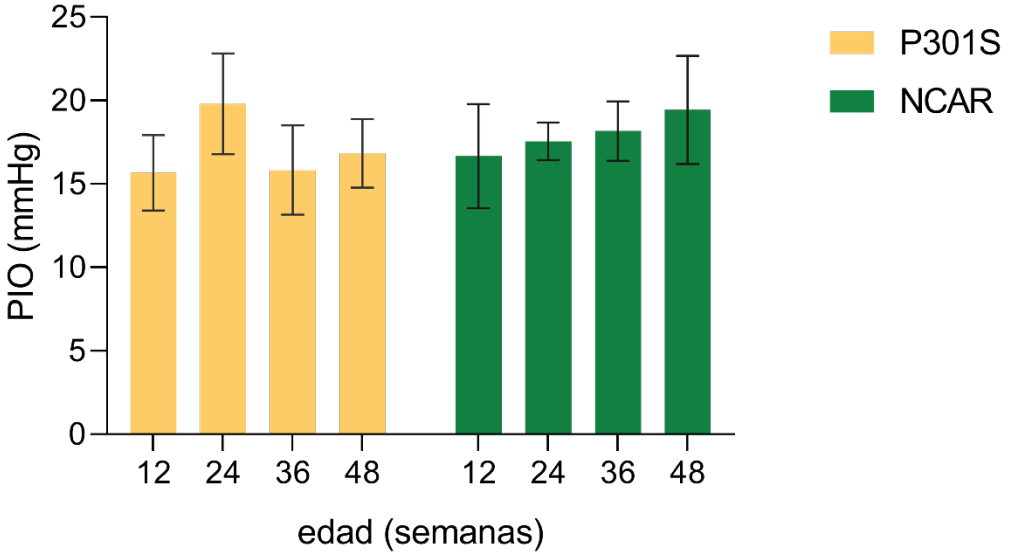


Figura 28. Comparativa intragrupo de la presión intraocular a 12, 24, 36, 48 semanas de edad. NCAR: ratonas no portadoras del gen P301S; PIO: presión intraocular; P301S: ratonas hemicigóticas modificadas genéticamente para expresar el gen humano P301S.

Estudio cualitativo por imagen OCT del fondo de ojo de ratones P301S

En el estudio de las imágenes de fondo de ojo de los animales NCAR se puede observar una estructura central circular más hiperreflectiva que constituye el nervio óptico. Las líneas blancas que se expanden del nervio óptico son las venas y las arterias que conforman las arcadas vasculares de la retina del animal. Las imágenes IR de fondo de ojo de los animales NCAR no muestran cambios cualitativos estructurales a lo largo de los tiempos de estudios (Figura 29).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

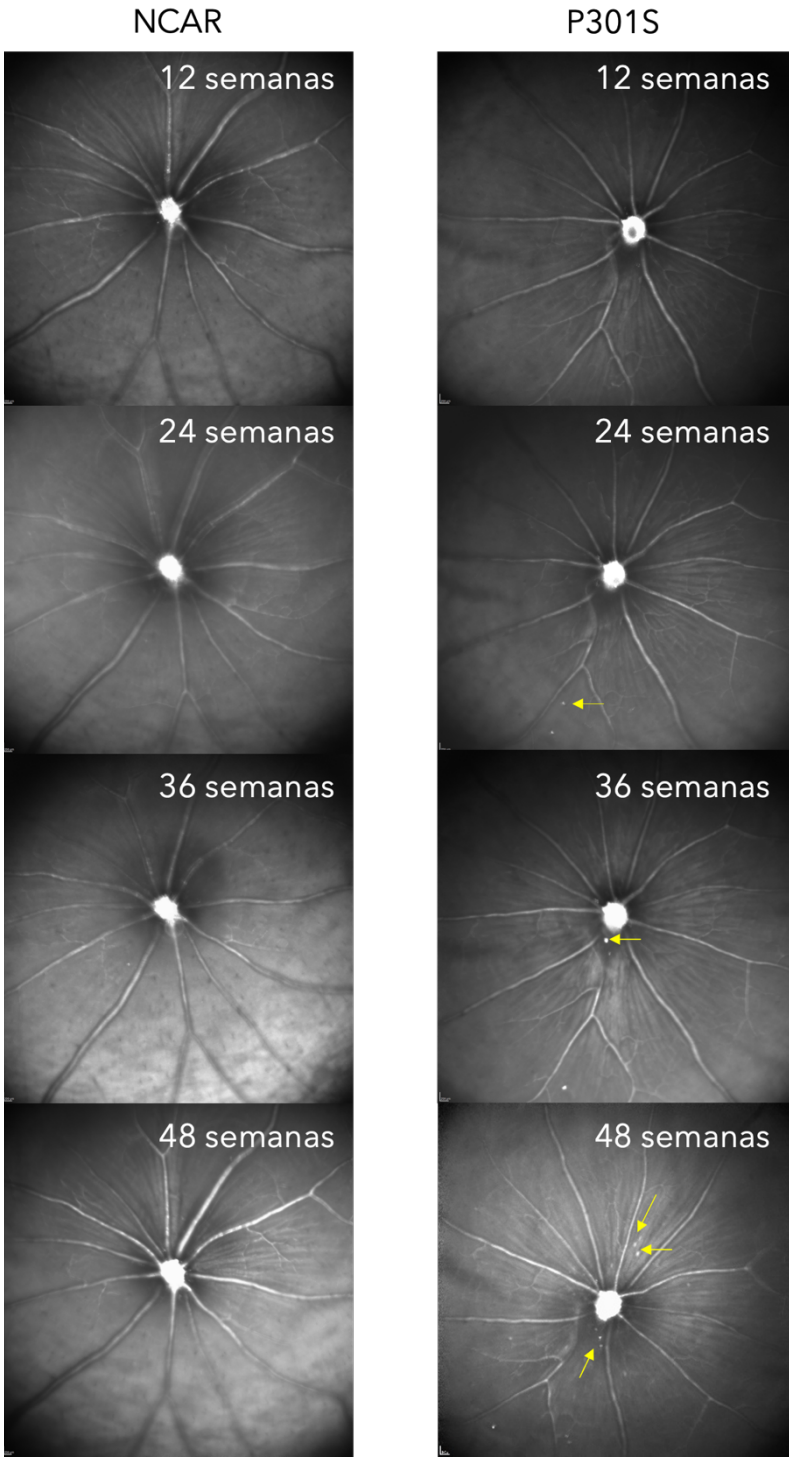


Figura 29. Imágenes representativas del fondo de ojo de las retinas de los animales NCAR y P301S analizadas en los diferentes puntos temporales evaluados. En el centro de las imágenes, el nervio óptico se muestra como un círculo blanco hiperreflectivo y se pueden ver las diferentes arcadas vasculares como líneas blancas hiperreflectivas que se expanden desde el nervio óptico. En amarillo están remarcadas las zonas donde se encuentran los puntos blancos hiperreflectivos. NCAR: ratones no portadores del gen P301S P3901S; OD: ojo derecho; OS: ojo izquierdo.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

En el análisis cualitativo de las imágenes IR del fondo de ojo de los animales P301S se han hallado puntos hiperreflectivos localizados alrededor del nervio óptico conforme avanzaba el tiempo de estudio (Figura 29).

En el análisis comparativo entre el grupo P301S y NCAR a las 48 semanas, se encontró que el 90% de los ojos estudiados del grupo P301S presentaban puntos hiperreflectivos, mientras que sólo el 33% de los ratones NCAR presentaban puntos hiperreflectivos alrededor del nervio óptico.

Análisis del espesor de las capas de la retina de los ratones P301S

En las figuras 30 y 31 se muestran imágenes OCT longitudinales representativas de la retina de los ratones evaluados en los diferentes puntos temporales analizados. Se puede observar, a la izquierda de cada adquisición, la imagen del fondo de ojo con un área delimitada en verde correspondiente al área medida para la interpretación posterior del espesor retiniano. La Figura 30 corresponde a imágenes B-Scans del mismo ratón NCAR evaluadas a lo largo del tiempo mientras que la Figura 31 corresponde a B-Scans longitudinales medidas en un ratón P301S. Como puede observarse en la línea horizontal verde de las imágenes de fondo de ojo, se representó una sección centrada en el nervio óptico para el grupo NCAR (Figura 30) y para el grupo P301S (Figura 31). En ambas figuras es posible discernir, debido a las diferentes reflectividades, todas las capas retinianas en la imagen OCT que se han analizado a continuación.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

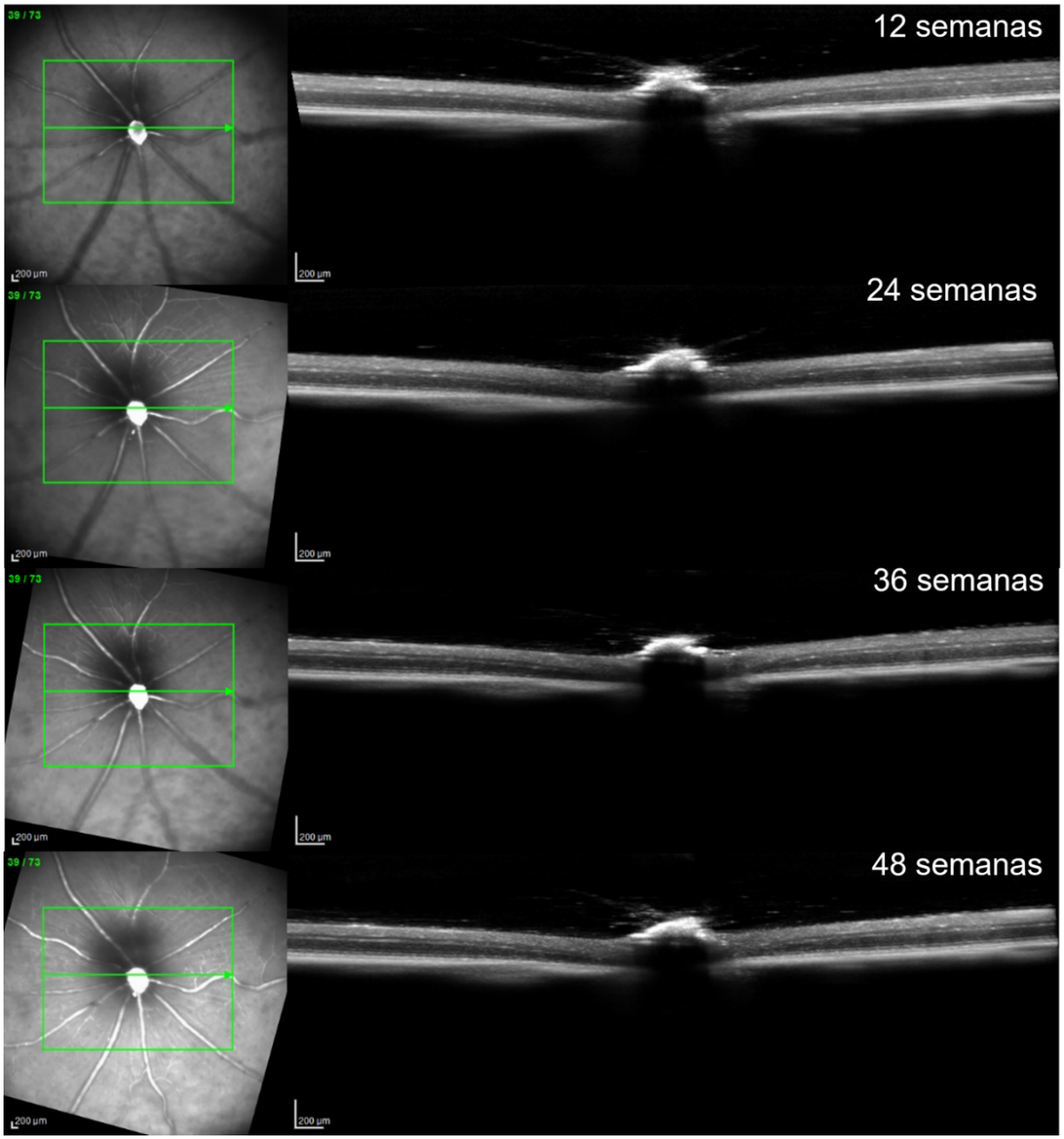


Figura 30. Imágenes OCT longitudinales representativas de las exploraciones centradas en el nervio óptico del grupo NCAR. El área analizada y la dirección de la adquisición se indican con un rectángulo verde y una flecha, respectivamente.

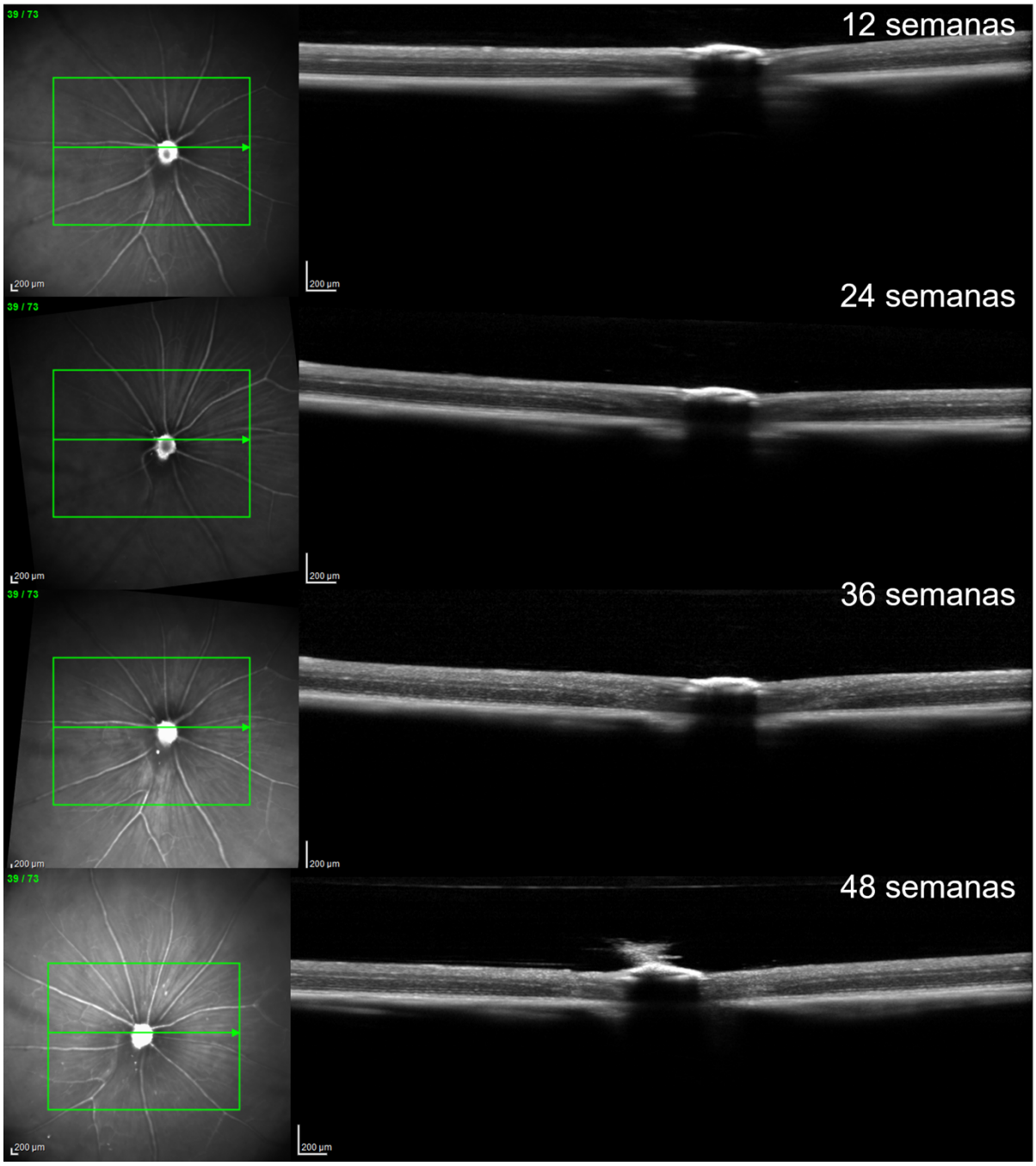


Figura 31. Imágenes OCT longitudinales representativas de las exploraciones del grupo P301S. El área analizada y la dirección de la adquisición se indican con un rectángulo verde y una flecha, respectivamente.

El análisis descriptivo y las comparaciones intergrupo de los grosores retinianos en relación con los sectores evaluados para los ratones P301S y NCAR se detallan en el material suplementario (Tablas 2-9).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Como puede observarse en la Figura 32, los ratones P301S han mostrado un menor espesor en la **capa de fibras nerviosas de la retina peripapilar (pRNFL)** para todos los sectores analizados en todos los momentos estudiados en comparación con los ratones NCAR, aunque sin diferencias estadísticamente significativas (α n. s). En la comparación intragrupo de los ratones P301S, se observó un aumento del espesor en pRNFL en el sector NS y TS a las 36 semanas en comparación con el resto de los tiempos evaluados, aunque también sin diferencias estadísticamente significativas (α n. s) (Tabla 2 del material suplementario).

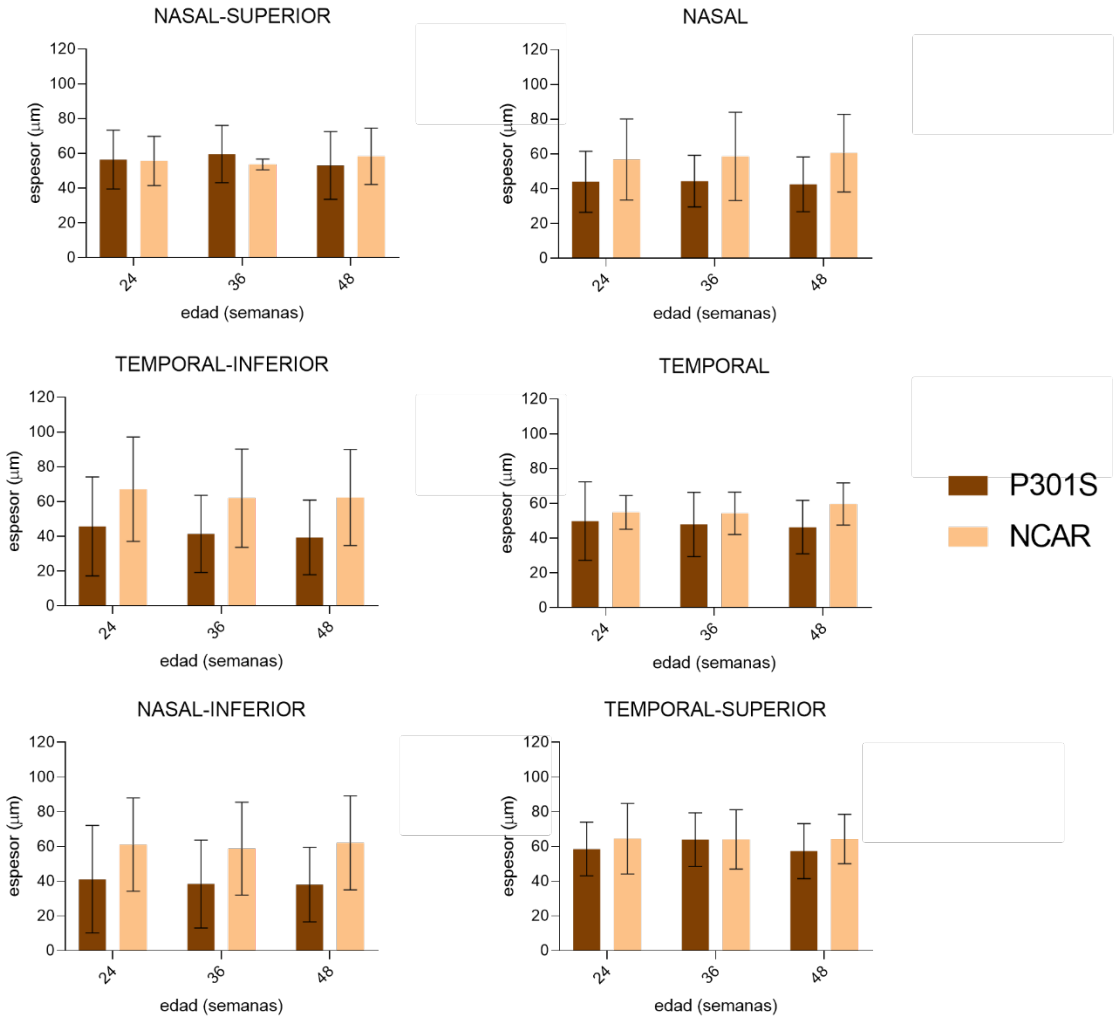
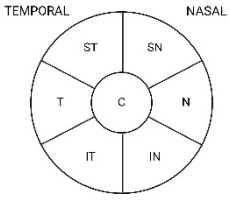


Figura 32. Valores medios, desviación estándar y comparación del grosor de la capa de fibras nerviosas de la retina peripapilar en diferentes untos temporales y sectores evaluados. NCAR: ratones no portadores; P301S: ratones modificados genéticamente c con el gen humano P301S. *: valor α <0,05.



En la comparación entre grupos del **espesor retiniano total** entre los ratones P301S y NCAR (Figura 33), se encontró una disminución estadísticamente significativa en el grupo P301S con respecto al NCAR a las 12 semanas para todos los sectores evaluados (excepto N1), a las 24 semanas para el sector S1 e I y a las 48 semanas para el sector S (α<0,05) (Tabla 3 del material suplementario). Aunque no se encontraron diferencias significativas, en el análisis intragrupo del grupo P301S se halló un aumento progresivo del grosor total de la retina en todos los sectores analizados a lo largo de los puntos temporales que se invierte a las 36 semanas. En este momento, se observó una disminución no significativa del grosor total de la retina (α n.s).

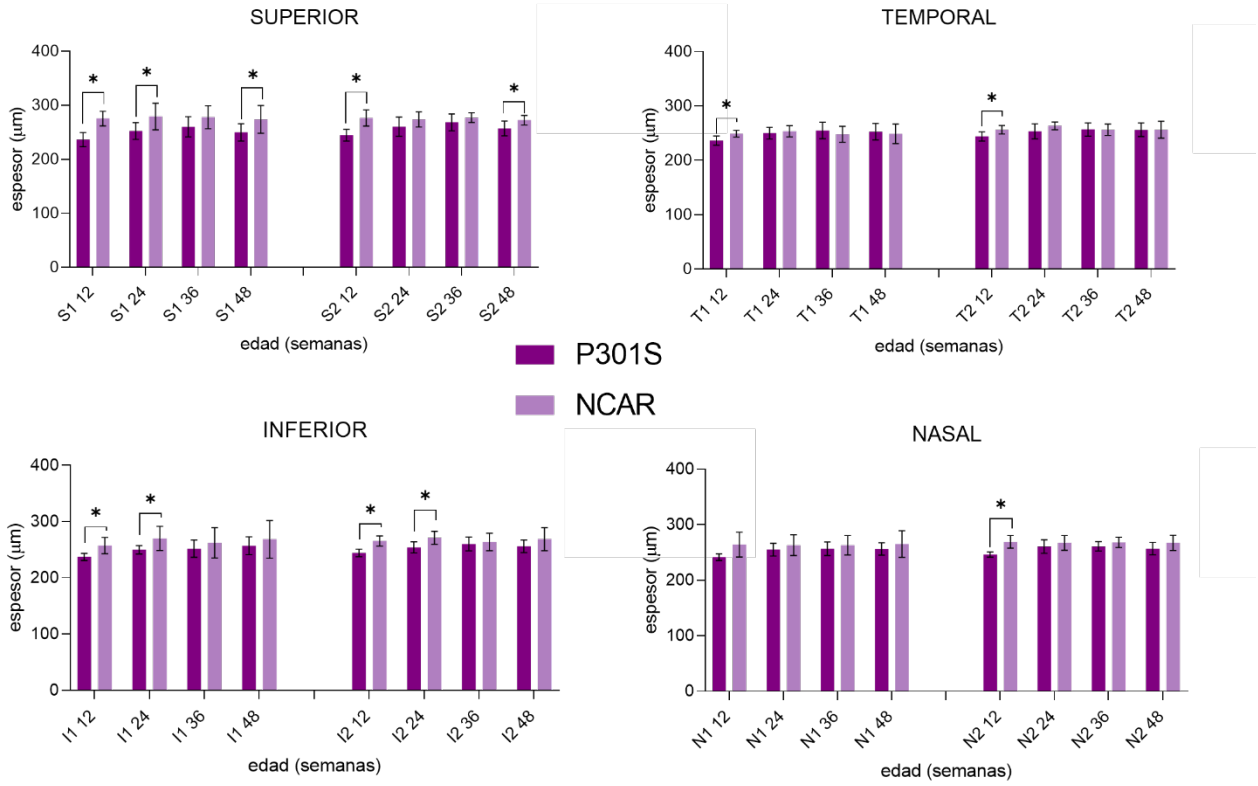
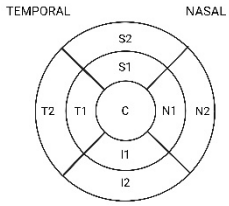


Figura 33. Valores medios, desviación estándar y comparación del grosor total de la retina en diferentes puntos temporales y sectores evaluados. I1: sector inferior interno; I2: sector inferior externo; N1: sector nasal interno; N2: sector nasal externo; S1: sector superior interno; S2: sector superior externo; T1: sector temporal interno; T2: sector temporal externo; NCAR: ratones no portadores; P301S: ratones modificados genéticamente con el gen humano P301S; *: valor p<0,05.



Con respecto al espesor de la **capa de células ganglionares (CCG)** del grupo P301S y NCAR, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (α n.s). Sin embargo, se puede observar un mayor espesor de CCG en todos los sectores de los animales P301S en comparación con el espesor del grupo NCAR. En la comparación intragrupo, aún sin diferencias significativas, el espesor de la CCG de los ratones P301S experimenta un aumento en torno a las 24-36 semanas, seguido de una disminución a las 48 semanas (α n.s) (Tabla 4 del material suplementario) (Figura 34).

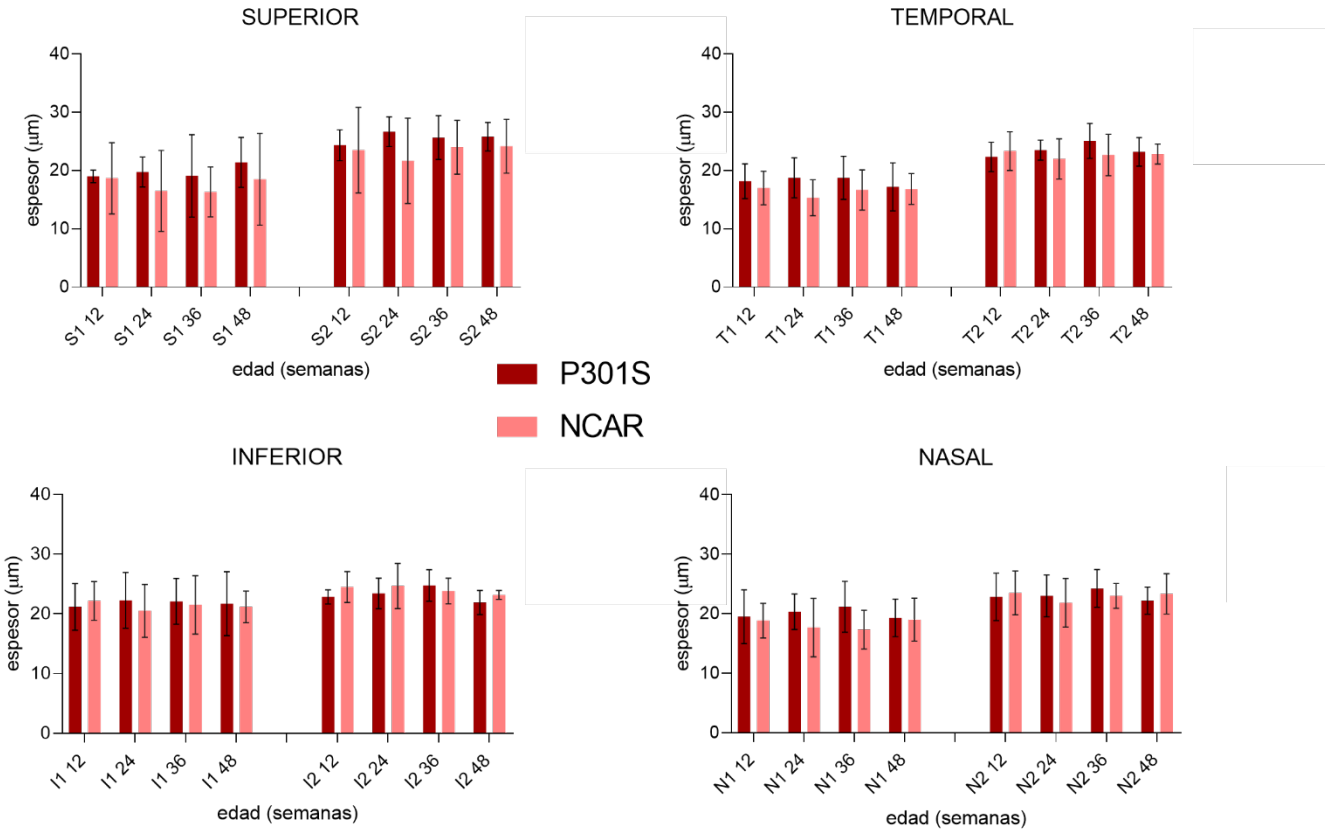
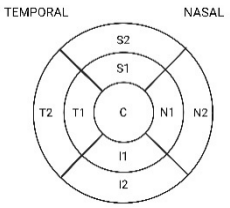


Figura 34. Valores medios, desviación estándar y comparación del grosor de la capa de células ganglionares en diferentes puntos temporales y sectores evaluados. I1: sector inferior interno; I2: sector inferior externo; N1: sector nasal interno; N2: sector nasal externo; S1: sector superior interno; S2: sector superior externo; T1: sector temporal interno; T2: sector temporal externo; NCAR: ratones no portadores; P301S: ratones modificados genéticamente con el gen humano P301S; *: valor p<0,05



No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la comparación entre grupos en el espesor retiniano de la **capa plexiforme interna (CPI)** (α n.s) (Tabla 5 del material suplementario) (Figura 35). Como puede observarse en la Figura 35, el espesor de la CPI de los ratones P301S medido en el sector superior y nasal proporcionó valores más altos a las 36 semanas. Estos valores no se mantuvieron a las 48 semanas, produciéndose una disminución del espesor medio. En el sector inferior se observó un aumento no significativo a las 24 seguido de una disminución a las 36 semanas que no se mantuvo a las 48 semanas de vida (α n.s).

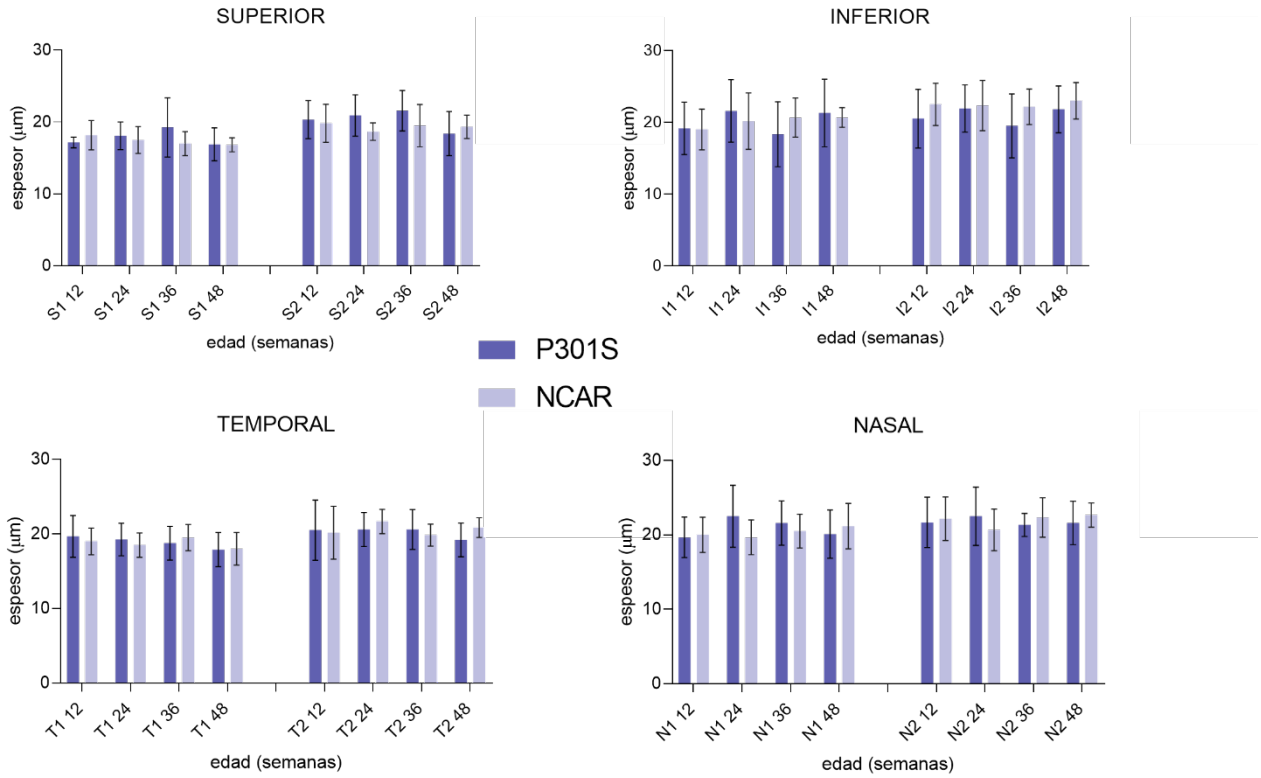
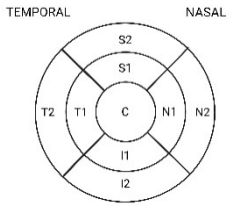


Figura 35. Valores medios, desviación estándar y comparación del grosor de la capa plexiforme interna en diferentes puntos temporales y sectores evaluados. I1: sector inferior interno; I2: sector inferior externo; N1: sector nasal interno; N2: sector nasal externo; S1: sector superior interno; S2: sector superior externo; T1: sector temporal interno; T2: sector temporal externo; NCAR: ratones no portadores; P301S: ratones modificados genéticamente con el gen humano P301S; *: valor α <0,05.



En la comparación entre grupos del espesor de la **capa nuclear interna (CNI),** se detectó una disminución significativa a la semana 12 en el sector inferior (I1) y a las 24 y 36 semanas en los sectores temporal (T1) y nasal (N1) respectivamente (Tabla 6 del material suplementario). (Figura 36). Como puede observarse en la Figura 35, en el estudio comparativo dentro del grupo P301S, se detectó un aumento no significativo del espesor de la CNI a las 24 semanas en todos los sectores analizados (α n.s). Finalmente, a partir de la semana 36 de estudio, el espesor empezó a disminuir progresivamente de manera no significativa (α n.s).

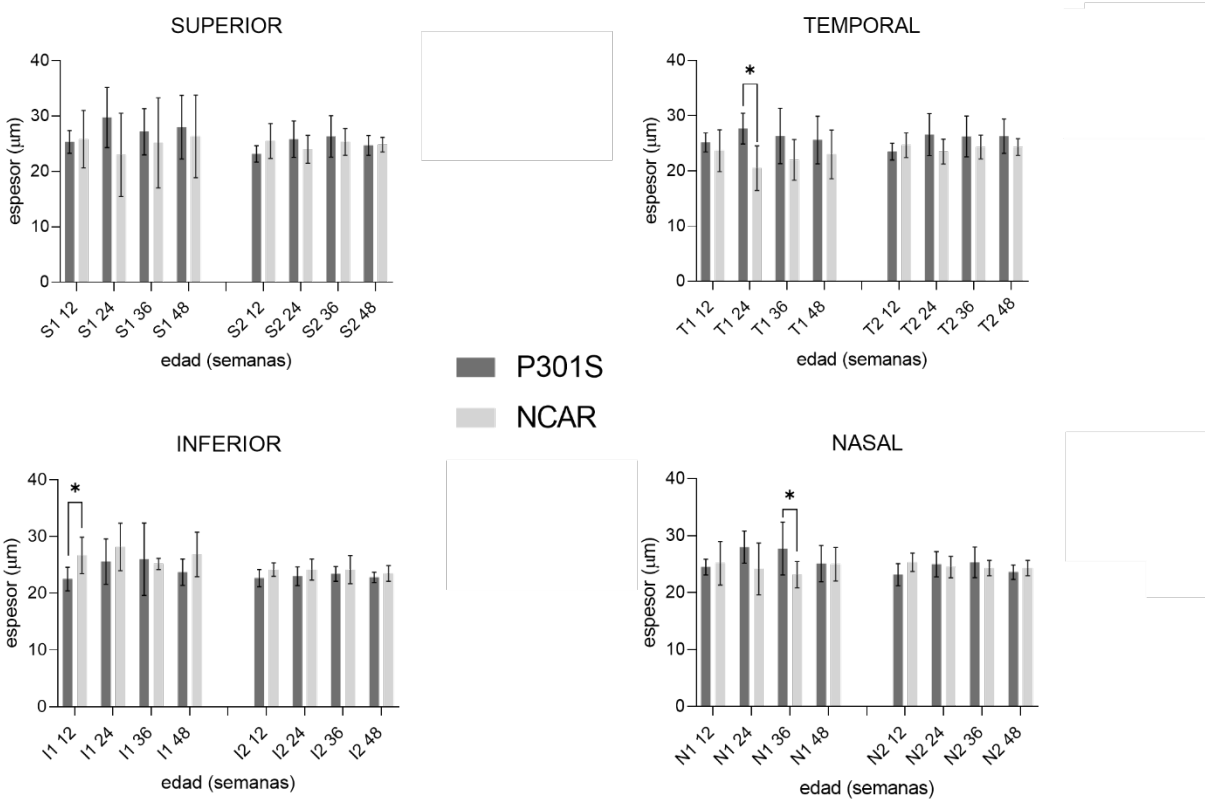
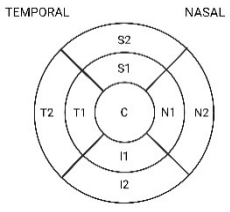
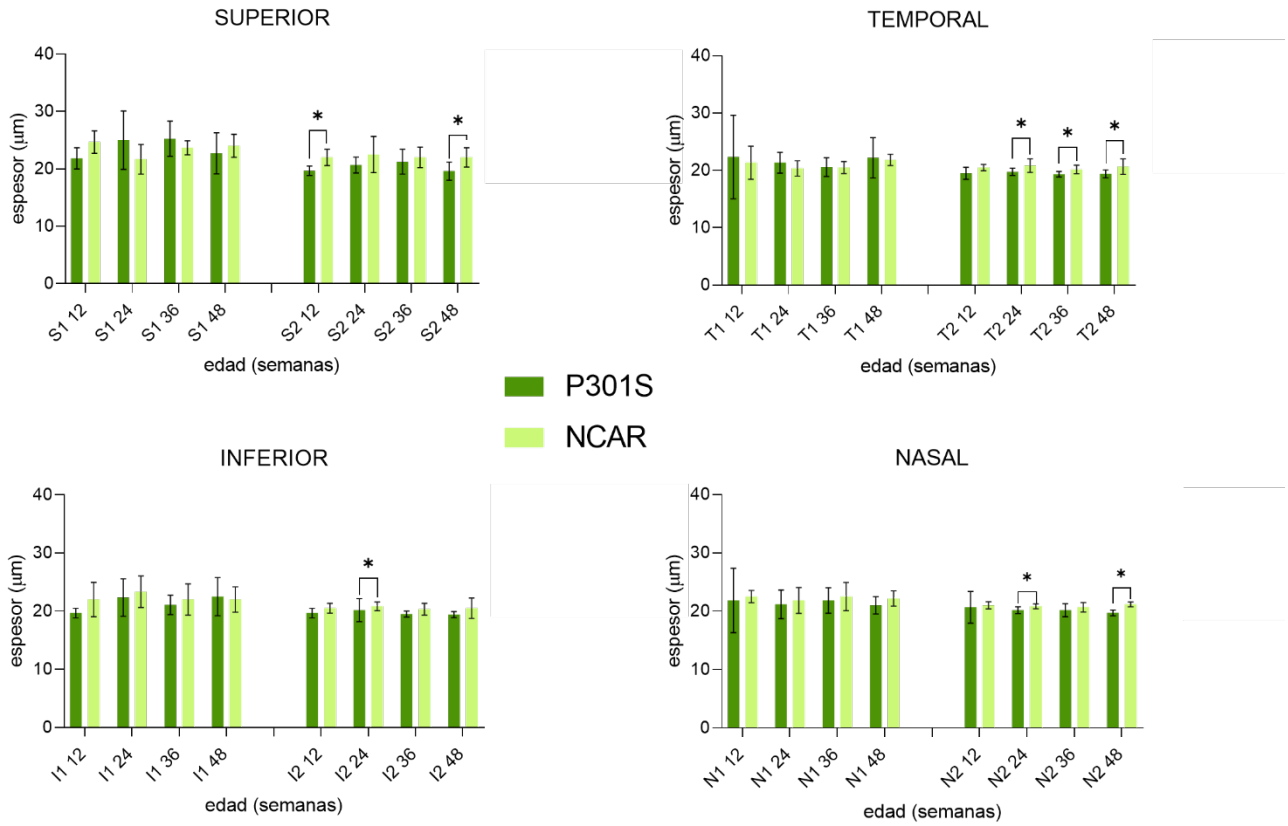


Figura 36. Valores medios, desviación estándar y comparación del grosor de la capa nuclear interna en diferentes puntos temporales y sectores evaluados. I1: sector inferior interno; I2: sector inferior externo; N1: sector nasal interno; N2: sector nasal externo; S1: sector superior interno; S2: sector superior externo; T1: sector temporal interno; T2: sector temporal externo; NCAR: ratones no portadores; P301S: ratones modificados genéticamente con el gen humano P301S; *: valor α <0,05.



En el análisis de la **capa plexiforme externa (CPE)**, los ratones P301S presentaron espesores significativamente menores en comparación con el grupo NCAR en los sectores nasal (N2), superior (S2) y temporal (T2) a las 24-48 semanas, 12-48 semanas y 24-36-48 semanas respectivamente (α<0,05) (Tabla 7 del material suplementario) (Figura 37). En el análisis intragrupo del grupo P301S, se observa la misma tendencia que en análisis anteriores, existe un aumento no significativo del espesor de la CPE en torno a las 24-36 semanas que no se mantiene, produciéndose una disminución del espesor en los últimos tiempos de estudio en todos los sectores analizados (α n.s).



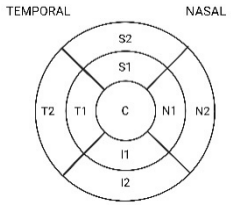


Figura 37. Valores medios, desviación estándar y comparación del grosor de la capa plexiforme externa en diferentes puntos temporales y sectores evaluados. I1: sector inferior interno; I2: sector inferior externo; N1: sector nasal interno; N2: sector nasal externo; S1: sector superior interno; S2: sector superior externo; T1: sector temporal interno; T2: sector temporal externo; NCAR: ratones no portadores; P301S: ratones modificados genéticamente con el gen humano P301S; *: valor α <0,05.

En el análisis de la **capa nuclear externa (CNE)**, los ratones P301S obtuvieron menores espesores, que mostraron diferencias estadísticamente significativas con respecto a los NCAR a las 12 y 24 semanas en los sectores superior (S1 y S2) y temporal (T1) respectivamente, mientras que el espesor del sector nasal (N1) y el sector inferior (I2) sólo disminuyó significativamente a las 12 y 24 semanas respectivamente ($\alpha<0,05$) (Tabla 8 del material suplementario) (figura 38). En la Figura 38, en el grupo P301S se puede observar una tendencia diferente al resto de capas analizadas, a partir de la semana 24 empieza un aumento progresivo en todos los sectores analizados que se mantiene a lo largo de los tiempos de estudio (α n.s).

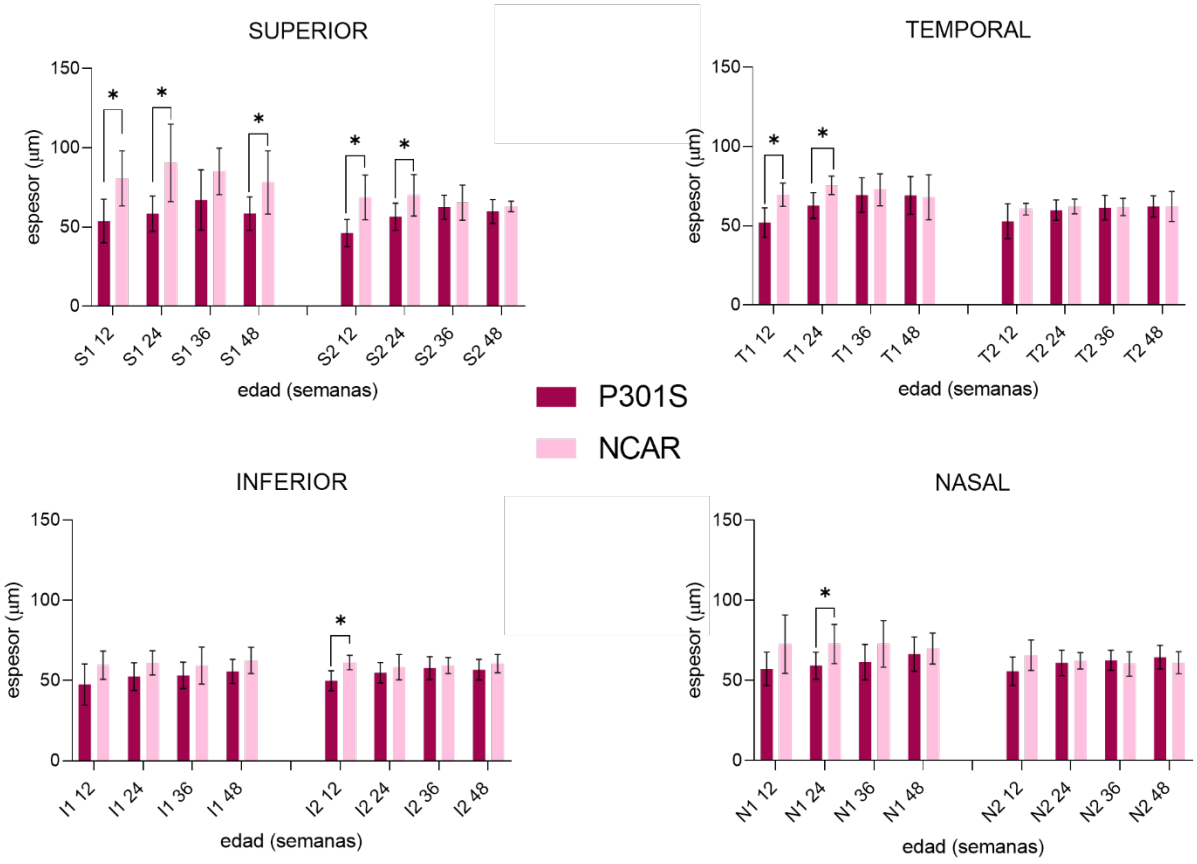
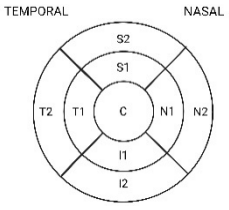


Figura 38. Valores medios, desviación estándar y comparación del grosor de la capa nuclear externa en diferentes puntos temporales y sectores evaluados. I1: sector inferior interno; I2: sector inferior externo; N1: sector nasal interno; N2: sector nasal externo; S1: sector superior interno; S2: sector superior externo; T1: sector temporal interno; T2: sector temporal externo; NCAR: ratones no portadores; P301S: ratones modificados genéticamente con el gen humano P301S; *: valor α <0,05.



Por último, se observaron valores inferiores en el **espesor del epitelio pigmentario de la retina (EPR)** en los ratones P301S con diferencias estadísticamente significativas en comparación con los ratones NCAR en el sector exterior superior (S2) a las 24, 36, 48 semanas; en el sector interno temporal (T1) a las 24 y 48 semanas y en el sector interior nasal (N1) a las 24 semanas (α<0,05) (Tabla 9 del material suplementario) (Figura 39). No se observaron tendencias claras en el análisis de los cambios de espesor del grupo P301S.

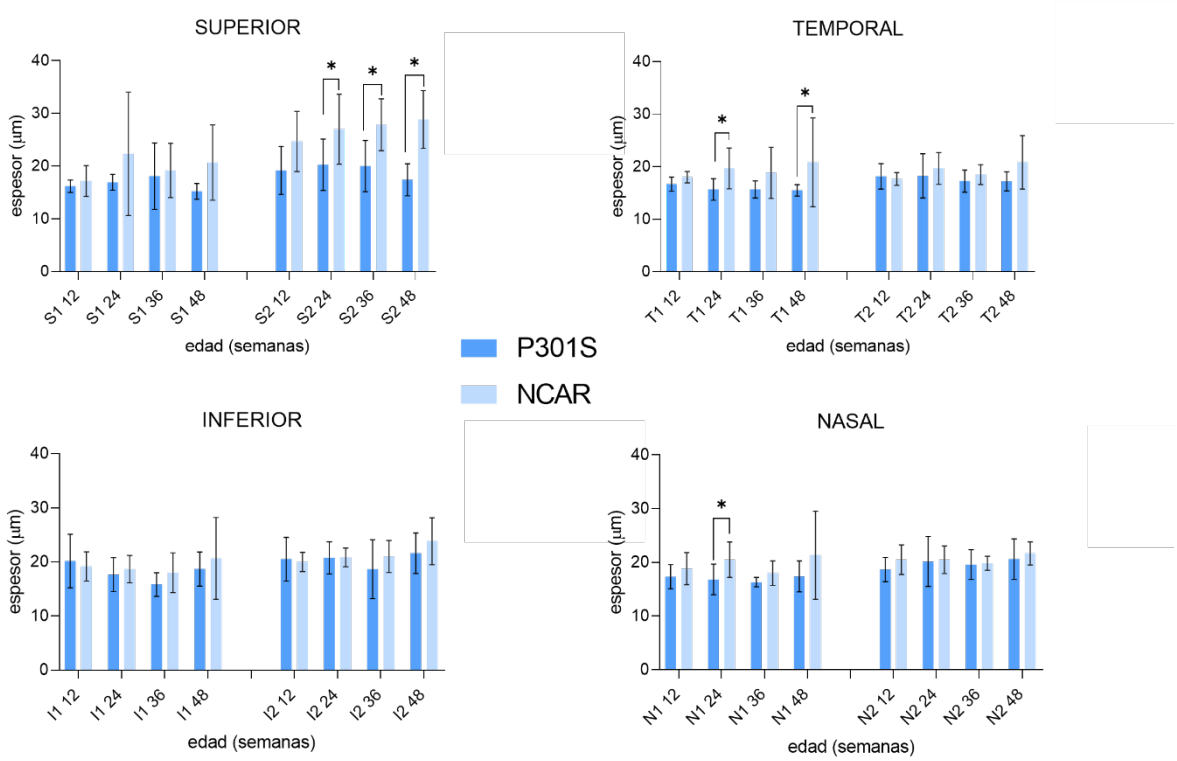
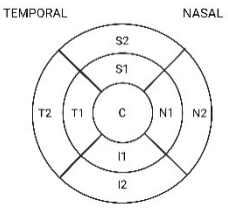


Figura 39. Valores medios, desviación estándar y comparación del grosor del epitelio pigmentario de la retina en diferentes puntos temporales y sectores evaluados. I1: sector inferior interno; I2: sector inferior externo; N1: sector nasal interno; N2: sector nasal externo; S1: sector superior interno; S2: sector superior externo; T1: sector temporal interno; T2: sector temporal externo; NCAR: ratones no portadores; P301S: ratones modificados genéticamente con el gen humano P301S; *: valor α<0,05.



Discusión

Durante esta sección se ha realizado un análisis y caracterización longitudinal de los cambios retinianos presentes en un modelo murino de tauopatía con técnicas de imagen no invasivas de OCT. Además, se mostró la degeneración retiniana del modelo P301S presente en las diferentes capas de la retina en un estudio longitudinal de un año de duración.

La EA es una patología que disminuye progresivamente la capacidad cognitiva y funcional del cerebro, es por tanto una enfermedad neurodegenerativa multifactorial, la cual tiene como características principales la acumulación de placas de βA y ovillos neurofibrilares de p-tau. A menudo los pacientes con EA muestran síntomas de pérdida de la agudeza visual y sensibilidad al contraste, sobre todo en condiciones de baja luminosidad (274,275). A su vez el campo de visión y la visión del color se pueden encontrar alteradas en pacientes con EA y pueden ser indicadores de la progresión de la enfermedad (276,277). Estas alteraciones están asociadas a cambios patológicos neurodegenerativos que ocurren en el SNC, lo que confirmaría el empleo de la retina para el estudio del SNC (278). Inicialmente, el análisis oftalmológico en esta patología se ha basado en estudios post-mortem sobre los cambios y la acumulación de las placas de βA en la retina (279,280). La necesidad de hallar nuevos biomarcadores tempranos de la enfermedad para buscar nuevas alternativas terapéuticas, ha provocado un aumento en la búsqueda de modelos animales que permitan incrementar el conocimiento sobre la fisiopatología de la enfermedad (281–284).

Inicialmente, los estudios sobre los cambios retinianos en modelos animales de EA se han centrado en la patología βA de modelos murinos transgénicos (280,285). La patología relacionada con la proteína tau ha sido tradicionalmente menos estudiada que la proteína βA, pero presenta una potencial diana como biomarcador temprano de la enfermedad. Un ejemplo de ello es el estudio de Márquez *et al.*, el cual demostró en un modelo transgénico de ratones tau hAPP, como la presencia de proteína tau es capaz de dañar las uniones sinápticas entre las neuronas, causando neuropatía periférica y pérdida la memoria (286). Por esa razón, el modelo caracterizado en la presente sección de la Tesis Doctoral mediante OCT es el modelo murino P301S, el cual expresa el gen mutante P301S de la proteína tau asociada a MAPTs (248).

El conocimiento sobre la asociación entre las enfermedades oculares con las enfermedades neurodegenerativas está en aumento. El glaucoma, una neuropatía

USC DE COMPOSTELA

óptica que se caracteriza por muerte de las células ganglionares de la retina, adelgazamiento de la capa de fibras nerviosas y daño axonal presenta diversos factores de riesgo como es la edad y la PIO alta (33). Se ha demostrado que el glaucoma primario de ángulo abierto, que es aquel que se caracteriza por una PIO elevada, podría estar relacionada con casos de EA (287) y que los nervios ópticos de los pacientes con EA pueden ser más vulnerables y menos resistentes al daño producido por una PIO elevada (288). Por ello, es necesario el estudio de las posibles variaciones de la PIO para poder frenar uno de los factores de riesgo y evitar la progresión de la muerte axonal del nervio óptico asociado al glaucoma. Al estudiar las variaciones de PIO, se ha observado que no existen diferencias reseñables a lo largo de los tiempos de estudio en ninguno de los grupos estudiados. Gupta *et al.* observó valores ligeramente altos en ratones que expresan placas de βA. Este hallazgo lo relaciona a la posible agregación de las placas en el humor vítreo y acuoso, pudiéndose depositar en la red trabecular e impedir la eliminación de los humores oculares (289). A su vez, otros autores han considerado que la expresión de βA tiene una relación directa con la muerte de las células ganglionares en el glaucoma, relacionando esta enfermedad con la EA (290) y la elevación crónica de la PIO con una mayor expresión de βA en la cabeza del nervio óptico (291). Tradicionalmente se han considerado la fisiología y las patologías oculares no dependientes del sexo biológico del sujeto. En los últimos años está aumentando la investigación de la influencia de los receptores hormonales en patologías oculares. Diferentes estudios clínicos y preclínicos han analizado el efecto protector de los estrógenos en la prevención del glaucoma gracias a la reducción de la presión intraocular (292–294). En este sentido, las diferencias encontradas entre el resto de los autores y el presente estudio pueden deberse a que los modelos animales difieren en cuanto al tipo de patología de EA empleado ya que el modelo P301S no expresa placas de βA que puedan provocar un daño glaucomatoso relacionado. Finalmente hay que destacar que, en el presente estudio, ambos grupos estudiados eran hembras por lo que futuros estudios deberían analizar la posible influencia del sexo en los resultados de la PIO.

Los hallazgos encontrados en el trabajo de la presente Tesis Doctoral muestran mediante técnicas no invasivas y en imagen IR, que conforme va avanzando la edad de los ratones aumentan los puntos hiperreflectivos en las imágenes de fondo de ojo. A su vez se ha observado que los animales del modelo animal P301S desarrollaron más puntos hiperreflectivos alrededor del nervio óptico. Dicha hiperreflectancia podrían ser inclusiones fibrilares de proteína tau hiperfosforilada, resultados que concordarían

USC DE COMPOSTELA

con los resultados de Schön *et al*.. Dicho autor halló la presencia de señales fluorescentes con ayuda del módulo de fluorescencia de OCT en el fondo de ojo de ratones del modelo P301S a los 5 meses de edad y confirmó mediante inmunohistoquímica que correspondían a inclusiones fibrilares de proteína tau hiperfosforilada presentes dentro de las células de la CCG (295). A su vez, se ha descrito en diversos estudios en retinas humanas, la presencia de proteína tau en capas retinianas donde se realizan las conexiones sinápticas, como es la CPI y la CPE (296,297).

Los hallazgos histopatológicos cerebrales en la EA se han establecido como 'Gold Standard' a la hora de describir los signos de esta enfermedad, pero recientemente, la búsqueda de biomarcadores se está centrando en tejidos más accesibles como es la retina. La obtención de imágenes de OCT permite el seguimiento longitudinal de enfermedades con afectación retiniana. En este contexto, en relación con los estudios del espesor de las diferentes capas retinianas, en las últimas décadas se ha demostrado la correlación entre la EA y la degeneración de las capas de la retina a través del adelgazamiento de la pRNFL, CCG, y la CPI (142,282).

Es este estudio, se han observado cambios en el espesor retiniano en todas las capas analizadas a lo largo del tiempo dentro del grupo de animales P301S y en comparación con los controles de su misma edad. A su vez, la degeneración estructural observada coincide con la edad en la que se empiezan a detectar las manifestaciones tempranas de la patología en este modelo animal, es decir, a las 24-36 semanas que equivaldrían entre los 6 y 9 meses respectivamente (248). Los axones de las células ganglionares que conforman el nervio óptico, conectado al cerebro, tienen una arquitectura alargada y carecen de mielina favoreciendo la transparencia de la retina y permitiendo el transporte de la señal de luz hasta el cerebro (298) . Por ello, el nervio óptico y las células ganglionares son más vulnerables a cualquier tipo de daño y son más susceptibles a una degeneración temprana. A su vez se ha descrito que las capas retinianas que más sufren los cambios degenerativos en pacientes con EA son las capas más internas de la retina como es la pRNFL en los cuadrantes superior e inferior y la GCL en el cuadrante superior (299). Estos cambios se han podido observar en pacientes con EA con deterioro cognitivo leve (300,301). En el presente estudio los hallazgos en el estudio del espesor de la pRNFL y en el espesor total de la retina sugieren que existe una degeneración axonal en la retina del modelo animal P301S siendo más acentuada en los cuadrantes superiores analizados. La pRNFL está compuesta en su mayoría por

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

los axones de las células ganglionares presentes en la CCG. Estos axones se organizan en haces formando el nervio óptico por lo que un daño en cualquiera de esas dos capas presupone un daño en la contigua. Esto coincidiría con la literatura descrita, la cual ha demostrado la neurodegeneración retiniana en pRNFL, el posible futuro daño de las células ganglionares y la pérdida del campo de visión más pronunciado en el cuadrante inferior (302).

En la retina existen tres tipos de plexos vasculares: el complejo vascular superficial, el plexo capilar intermedio y el plexo capilar profundo. Estos plexos son los encargados de irrigar sangre a la parte más interna de la CPI, la CPE y la CNI por lo que un daño vascular provocaría cambios estructurales en dichas capas. Estudios previos, han analizado las alteraciones en los vasos retinianos en ratones P301S, demostrando la relación directa entre la progresión de la enfermedad y los cambios en vasos retinianos. Según Buscho *et al.*, el plexo capilar interno y el plexo capilar profundo son las estructuras retinianas vasculares que antes sufren cambios en el modelo P301S (303). En nuestro estudio, se ha encontrado que los ratones P301S mostraron un espesor menor en CPI, CPE y CNI de las capas retinianas en los últimos tiempos de estudio en comparación con las primeras semanas de estudio. Estos resultados relacionarían la neurodegeneración retiniana con el daño vascular descrito en el modelo P301S.

El EPR es una monocapa celular que promueve el funcionamiento óptimo y la regeneración de los fotorreceptores (304). Una degeneración en esta capa pone en alerta la integridad celular y está relacionada con patologías retinianas que cursan con falta de visión y ceguera, como es la DMAE (305). A pesar de que la información acerca de la neurodegeneración retiniana en pacientes con EA está centrada en las capas más internas de la retina, en el presente trabajo se ha encontrado una disminución en el espesor del EPR en el cuadrante superior. Liu *et al.* estudió longitudinalmente la patología retiniana presente en ratas Fisher hembras y ratones 3xTg. En su estudio se encontró que ambos grupos animales mostraron signos retinianos similares a la patología de DMAE como es la degeneración de los fotorreceptores y atrofia en el EPR (306). El EPR es la capa donde se producen los mecanismos de endocitosis y fagocitosis. A su vez, se ha descrito la relación existente entre el daño de las vías endolisosomales y de autofagia con la demencia (304), por lo que podría tener relación el compromiso de la retina externa con la degeneración presentada por este modelo animal.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Finalmente cabe destacar en el presente estudio que existen algunas capas retinianas donde el espesor del modelo animal ha sido mayor en comparación con sus controles sanos de la misma edad, es el caso de la CCG, la CNI y la CPI. En la EA se produce un proceso de neuroinflamación y activación glial que conduce a la inflamación crónica de los tejidos del SNC (224). La microglía es un tipo celular que se encarga de la homeostasis del SNC. En condiciones normales se encuentra localizada en la CCG, CPI y CPE, pero puede migrar a otras capas retinianas como respuesta a un estímulo tóxico como es el caso de EA, donde se ha descrito la presencia de microglía en la CNI, la CPI y CPE (307,308). Salobrar-Garcia *et al.* demostró que dependiendo del nivel de deterioro cognitivo presente en pacientes con EA podían variar los hallazgos encontrados en el análisis del espesor de la pRNFL. Así pues, en los pacientes con EA leve, en vez de encontrar una disminución del espesor retiniano lo que se observó fue un aumento del grosor de la papila (309). A su vez, Cheung *et al.* en un estudio en pacientes con deterioro cognitivo leve mostró como el volumen macular se encontraba también engrosado, en contraposición de lo que se esperaría según la literatura (310). Estos hallazgos, junto con los observados en el presente trabajo demostrarían que la neuroinflamación que sucede en la EA provoca un cambio de localización y conformacional de las células microgliales ayudando así a la pérdida sináptica de las neuronas presentes en la retina (295,296).

Los resultados de este análisis constituyen el primer estudio en los que se muestran cambios longitudinales producidos en las retinas de roedores P301S con técnicas de imagen *in vivo* novedosas, como es la OCT. La presencia de neurodegeneración en las capas de la retina permite constituir al modelo P301S como un buen modelo animal para la evaluación de los cambios estructurales oculares provocados por la tauopatía. Por ello, este modelo animal, nos permitirá una adecuada evaluación de la potencial respuesta a nuevos fármacos en desarrollo. Las imágenes generadas durante la presente Tesis Doctoral han servido para que un grupo colaborador de inteligencia artificial de la Universidad de A Coruña pudiese generar nuevos algoritmos por IA (311). Teniendo en cuenta el nivel de caracterización retiniano que permite la OCT, podría concluirse que esta técnica permite la obtención de imágenes in vivo y de registros no invasivos longitudinales sin poner en riesgo el bienestar animal a la vez que permite valorar de una manera objetiva y reproducible los cambios y futuros seguimientos de la enfermedad.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Material suplementario

Tabla 2. Valores medio de espesor, desviación estándar y análisis intergrupo en μm para ambos ojos de ratones P301S y NCAR a las 12, 24, 36 y 48 semanas para la capa de fibras nerviosas de la retina en la zona peripapilar.

pRNFL		**12 semanas**		**24 semanas**		**36 semanas**		**48 semanas**	
		Media ± sd	α	Media ± sd	α	Media ± sd	α	Media ± sd	α
T	P301S	-	-	49,83 ± 22,59	0,48	47,92 ± 18,47	0,63	46,40 ± 15,31	0,14
	NCAR	-		54,83 ± 9,68		54,33 ± 12,14		59,67 ± 12,16	
TS	P301S	-	-	58,58 ± 15,48	0,54	64,00 ± 15,40	0,66	57,40 ± 15,88	0,38
	NCAR	-		64,50 ± 20,33		64,17 ± 17,09		64,33 ± 14,19	
TI	P301S	-	-	45,75 ± 28,46	0,17	41,42 ± 22,21	0,11	39,40 ± 21,44	0,11
	NCAR	-		67,17 ± 30,02		62,00 ± 28,22		62,33 ± 27,57	
N	P301S	-	-	44,00 ± 17,60	0,32	44,42 ± 14,82	0,24	42,60 ± 15,78	0,15
	NCAR	-		56,83 ± 23,32		58,67 ± 25,41		60,50 ± 22,37	
NS	P301S	-	-	56,42 ± 16,91	0,91	59,67 ± 16,51	0,2	53,10 ± 19,45	0,65
	NCAR	-		55,67 ± 14,14		53,67 ± 3,08		58,33 ± 16,19	
NI	P301S	-	-	41,17 ± 30,96	0,22	38,42 ± 25,35	0,21	38,10 ± 21,49	0,12
	NCAR	-		61,17 ± 26,91		58,83 ± 26,74		62,17 ± 27,13	

N: sector nasal; NCAR: ratones no portadores; NS: sector nasal superior; NI: sector nasal inferior; P301S: ratones modificados genéticamente con el gen humano P301S; T: sector temporal; TS: sector temporal superior; TI: sector temporal inferior.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 3. Valores medio de espesor, desviación estándar y análisis intergrupo en μm para ambos ojos de ratones P301S y NCAR a las 12, 24, 36 y 48 semanas para el espesor total de la retina.

Retina total		12 semanas		24 semanas		36 semanas		48 semanas	
		Media ± sd	α	Media ± sd	α	Media ± sd	α	Media ± sd	α
N1	P301S	241,50 ± 5,96	0,16	255,08 ± 11,48	0,51	256,75 ± 12,08	0,45	256,40 ± 11,27	0,54
	NCAR	264,17 ± 22,18		263,17 ± 18,78		263,00 ± 17,66		265,17 ± 23,90	
N2	P301S	246,17 ± 4,58	<0,01	260,67 ± 12,11	0,3	260,92 ± 8,51	0,3	256,90 ± 11,19	0,23
	NCAR	269,17 ± 11,43		267,17 ± 13,32		268,17 ± 9,33		267,17 ± 13,78	
S1	P301S	236,50 ± 12,85	<0,01	252,33 ± 15,35	0,02	260,25 ± 18,70	0,13	249,80 ± 16,07	0,04
	NCAR	275,33 ± 13,53		279,17 ± 24,62		277,83 ± 21,43		273,83 ± 25,83	
S2	P301S	244,67 ± 10,75	<0,01	260,42 ± 17,75	0,16	268,42 ± 15,44	0,3	257,20 ± 13,74	0,02
	NCAR	276,50 ± 14,98		273,83 ± 13,86		277,17 ± 9,09		272,33 ± 8,71	
T1	P301S	236,33 ± 8,52	<0,01	250,00 ± 10,74	0,57	254,92 ± 15,13	0,4	252,70 ± 15,11	0,48
	NCAR	249,00 ± 6,23		253,50 ± 10,43		247,83 ± 14,81		248,83 ± 17,85	
T2	P301S	244,00 ± 8,60	0,03	253,33 ± 13,80	0,11	256,67 ± 12,30	0,9	256,20 ± 12,53	0,98
	NCAR	256,33 ± 7,81		263,33 ± 7,26		256,33 ± 10,42		256,33 ± 15,65	
I1	P301S	237,17 ± 6,49	<0,01	249,67 ± 7,58	0,01	251,92 ± 15,38	0,57	256,90 ± 15,78	0,87
	NCAR	257,33 ± 14,46		270,00 ± 21,61		262,17 ± 27,14		268,33 ± 33,47	
I2	P301S	244,17 ± 6,71	<0,01	254,00 ± 9,95	<0,01	260,08 ± 12,37	0,73	255,90 ± 11,22	0,3
	NCAR	265,50 ± 8,87		271,00 ± 11,45		263,67 ± 15,37		268,67 ± 20,50	

N1: nasal interno; N2: nasal externo; NCAR: ratones no portadores; I1: inferior interno; I2: inferior externo; P301S: ratones modificados genéticamente con el gen humano P301S; S1: superior interno; S2: superior externo; T1: temporal interno; T2: temporal externo.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 4. Valores medio de espesor, desviación estándar y análisis intergrupo en μm para ambos ojos de ratones P301S y NCAR a las 12, 24, 36 y 48 semanas para la capa de células ganglionares.

CCG		12 semanas		24 semanas		36 semanas		48 semanas	
		Media ± sd	α	Media ± sd	α	Media ± sd	α	Media ± sd	α
N1	P301S	19,50 ± 4,51	0,81	20,33 ± 2,99	0,15	21,17 ± 4,28	0,08	19,30 ± 3,16	0,68
	NCAR	18,83 ± 2,93		17,67 ± 4,93		17,33 ± 3,27		19,00 ± 3,63	
N2	P301S	22,83 ± 3,97	0,97	23,00 ± 3,52	0,59	24,25 ± 3,17	0,39	22,20 ± 2,30	0,63
	NCAR	23,50 ± 3,67		21,83 ± 4,07		23,00 ± 2,10		23,33 ± 3,39	
S1	P301S	19,00 ± 1,10	0,91	19,75 ± 2,56	0,07	19,08 ± 7,08	0,6	21,40 ± 4,30	0,21
	NCAR	18,67 ± 6,12		16,50 ± 6,95		16,33 ± 4,27		18,50 ± 7,87	
S2	P301S	24,33 ± 2,66	0,66	26,67 ± 2,53	0,14	25,67 ± 3,75	0,46	25,80 ± 2,44	0,44
	NCAR	23,50 ± 7,34		21,67 ± 7,31		24,00 ± 4,60		24,17 ± 4,62	
T1	P301S	18,17 ± 2,99	0,47	18,75 ± 3,44	0,07	18,75 ± 3,70	0,22	17,20 ± 4,13	0,82
	NCAR	17,00 ± 2,90		15,33 ± 3,08		16,67 ± 3,44		16,83 ± 2,64	
T2	P301S	22,33 ± 2,50	0,68	23,50 ± 1,73	0,44	25,08 ± 3,00	0,12	23,20 ± 2,44	<0,99
	NCAR	23,33 ± 3,33		22,00 ± 3,46		22,67 ± 3,56		22,83 ± 1,72	
I1	P301S	21,17 ± 3,92	0,68	22,25 ± 4,65	0,44	22,08 ± 3,85	0,87	21,70 ± 5,33	0,65
	NCAR	22,17 ± 3,25		20,50 ± 4,42		21,50 ± 4,89		21,17 ± 2,64	
I2	P301S	22,83 ± 1,17	0,24	23,42 ± 2,57	0,51	24,75 ± 2,63	0,44	21,90 ± 2,02	0,19
	NCAR	24,50 ± 2,59		24,67 ± 3,78		23,83 ± 2,14		23,17 ± 0,75	

N1: nasal interno; N2: nasal externo; NCAR: ratones no portadores; I1: inferior interno; I2: inferior externo; P301S: ratones modificados genéticamente con el gen humano P301S; S1: superior interno; S2: superior externo; T1: temporal interno; T2: temporal externo.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 5. Valores medio de espesor, desviación estándar y análisis intergrupo en μm para ambos ojos de ratones P301S y NCAR a las 12, 24, 36 y 48 semanas para la capa plexiforme interna.

CPI		12 semanas		24 semanas		36 semanas		48 semanas	
		Media ± sd	α	Media ± sd	α	Media ± sd	α	Media ± sd	α
N1	P301S	19,67 ± 2,73	0,98	22,50 ± 4,17	0,19	21,58 ± 2,97	0,5	20,10 ± 3,25	0,55
	NCAR	20,00 ± 2,37		19,67 ± 2,34		20,50 ± 2,26		21,17 ± 3,06	
N2	P301S	21,67 ± 3,39	0,99	22,50 ± 3,92	0,37	21,33 ± 1,56	0,32	21,60 ± 2,91	0,57
	NCAR	22,17 ± 2,93		20,67 ± 2,80		22,33 ± 2,66		22,67 ± 1,63	
S1	P301S	17,17 ± 0,75	0,26	18,08 ± 1,93	0,56	19,25 ± 4,11	0,18	16,90 ± 2,28	0,97
	NCAR	18,17 ± 2,04		17,50 ± 1,87		17,00 ± 1,67		16,83 ± 0,98	
S2	P301S	20,33 ± 2,66	0,97	20,92 ± 2,87	0,14	21,58 ± 2,81	0,15	18,40 ± 3,06	0,51
	NCAR	19,83 ± 2,64		18,67 ± 1,21		19,50 ± 2,95		19,33 ± 1,63	
T1	P301S	19,67 ± 2,80	0,81	19,25 ± 2,18	0,42	18,75 ± 2,26	0,63	17,90 ± 2,28	0,78
	NCAR	19,00 ± 1,79		18,50 ± 1,64		19,50 ± 1,76		18,00 ± 2,19	
T2	P301S	20,50 ± 4,04	0,95	20,58 ± 2,27	0,34	20,58 ± 2,68	0,34	19,20 ± 2,25	0,08
	NCAR	20,17 ± 3,54		21,67 ± 1,63		19,83 ± 1,47		20,83 ± 1,33	
I1	P301S	19,17 ± 3,66	>0,99	21,58 ± 4,36	0,87	18,33 ± 4,52	0,27	21,30 ± 4,72	0,92
	NCAR	19,00 ± 2,83		20,17 ± 3,92		20,67 ± 2,73		20,67 ± 1,37	
I2	P301S	20,50 ± 4,09	0,46	21,92 ± 3,29	0,8	19,50 ± 4,46	0,14	21,80 ± 3,26	0,51
	NCAR	22,50 ± 2,95		22,33 ± 3,50		22,17 ± 2,48		23,00 ± 2,53	

N1: nasal interno; N2: nasal externo; NCAR: ratones no portadores; I1: inferior interno; I2: inferior externo; P301S: ratones modificados genéticamente con el gen humano P301S; S1: superior interno; S2: superior externo; T1: temporal interno; T2: temporal externo.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 6. Valores medio de espesor, desviación estándar y análisis intergrupo en μm para ambos ojos de ratones P301S y NCAR a las 12, 24, 36 y 48 semanas para la capa nuclear interna.

CNI		**12 semanas**		**24 semanas**		**36 semanas**		**48 semanas**	
		Media ± sd	α	Media ± sd	α	Media ± sd	α	Media ± sd	α
N1	P301S	24,50 ± 1,38	0,65	28,00 ± 2,83	0,13	27,75 ± 4,63	0,02	25,10 ± 3,18	>0,99
	NCAR	25,17 ± 3,82		24,17 ± 4,54		23,17 ± 2,32		25,00 ± 2,97	
N2	P301S	23,17 ± 1,94	0,07	25,00 ± 2,22	0,69	25,33 ± 2,67	0,49	23,60 ± 1,26	0,27
	NCAR	25,33 ± 1,63		24,50 ± 1,87		24,33 ± 1,37		24,33 ± 1,37	
S1	P301S	25,33 ± 2,07	>0,99	29,75 ± 5,45	0,08	27,17 ± 4,20	0,59	28,00 ± 5,75	0,54
	NCAR	25,83 ± 5,19		23,00 ± 7,51		25,17 ± 8,13		26,33 ± 7,45	
S2	P301S	23,17 ± 1,47	0,12	25,83 ± 3,30	0,41	26,33 ± 3,75	0,44	24,70 ± 1,77	0,91
	NCAR	25,50 ± 3,15		24,00 ± 2,53		25,33 ± 2,42		24,83 ± 1,33	
T1	P301S	25,17 ± 1,72	0,62	27,67 ± 2,77	>0,01	26,33 ± 5,03	0,09	25,60 ± 4,33	0,35
	NCAR	23,67 ± 3,78		20,50 ± 4,04		22,00 ± 3,69		23,00 ± 4,43	
T2	P301S	23,50 ± 1,52	0,61	26,58 ± 3,80	0,06	26,25 ± 3,70	0,37	26,30 ± 3,13	0,19
	NCAR	24,67 ± 2,25		23,50 ± 2,26		24,33 ± 2,16		24,33 ± 1,51	
I1	P301S	22,50 ± 2,07	0,04	25,58 ± 3,99	0,22	26,00 ± 6,37	0,86	23,70 ± 2,31	0,08
	NCAR	26,67 ± 3,20		28,17 ± 4,17		25,17 ± 0,98		26,83 ± 3,92	
I2	P301S	22,67 ± 1,51	0,08	23,00 ± 1,65	0,19	23,42 ± 1,31	0,59	22,80 ± 0,92	0,25
	NCAR	24,17 ± 1,17		24,17 ± 1,83		24,17 ± 2,48		23,50 ± 1,38	

N1: nasal interno; N2: nasal externo; NCAR: ratones no portadores; I1: inferior interno; I2: inferior externo; P301S: ratones modificados genéticamente con el gen humano P301S; S1: superior interno; S2: superior externo; T1: temporal interno; T2: temporal externo.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 7. Valores medio de espesor, desviación estándar y análisis intergrupo en μm para ambos ojos de ratones P301S y NCAR a las 12, 24, 36 y 48 semanas para la capa plexiforme externa.

CPE		**12 semanas**		**24 semanas**		**36 semanas**		**48 semanas**	
		Media ± sd	α	Media ± sd	α	Media ± sd	α	Media ± sd	α
N**1**	P301S	21,83 ± 5,53	0,06	21,17 ± 2,44	0,47	21,83 ± 2,17	0,7	21,00 ± 1,49	0,13
	NCAR	22,50 ± 1,05		21,83 ± 2,23		22,50 ± 2,43		22,17 ± 1,33	
N2	P301S	20,67 ± 2,73	0,19	20,17 ± 0,58	0,04	20,17 ± 1,11	0,24	19,70 ± 0,48	<0,01
	NCAR	21,00 ± 0,63		20,83 ± 0,41		20,67 ± 0,82		21,17 ± 0,41	
S1	P301S	21,83 ± 1,83	0,05	25,00 ± 5,08	0,16	25,25 ± 3,08	0,28	22,70 ± 3,59	0,38
	NCAR	24,67 ± 1,97		21,67 ± 2,58		23,50 ± 4,04		24,00 ± 2,00	
S2	P301S	19,67 ± 0,82	0,02	20,67 ± 1,37	0,15	21,25 ± 2,18	0,59	19,60 ± 1,58	<0,01
	NCAR	22,00 ± 1,41		22,50 ± 3,15		22,00 ± 1,79		22,00 ± 1,67	
T1	P301S	22,33 ± 7,28	0,67	21,33 ± 1,83	0,27	20,58 ± 1,62	>0,99	22,20 ± 3,52	0,83
	NCAR	21,33 ± 2,88		20,33 ± 1,37		20,50 ± 1,05		21,83 ± 0,98	
T2	P301S	19,50 ± 1,05	0,13	19,75 ± 0,62	0,03	19,33 ± 0,49	0,03	19,40 ± 0,70	0,03
	NCAR	20,50 ± 0,55		20,83 ± 1,17		20,17 ± 0,75		20,67 ± 1,37	
I1	P301S	19,67 ± 0,82	0,07	22,33 ± 3,20	0,36	21,08 ± 1,68	0,54	22,50 ± 3,27	0,95
	NCAR	22,00 ± 2,97		23,33 ± 2,73		22,00 ± 2,68		22,00 ± 2,19	
I2	P301S	19,67 ± 0,82	0,18	20,17 ± 1,99	0,04	19,50 ± 0,52	0,06	19,40 ± 0,52	0,09
	NCAR	20,50 ± 0,84		20,83 ± 0,75		20,33 ± 1,03		20,50 ± 1,76	

N1: nasal interno; N2: nasal externo; NCAR: ratones no portadores; I1: inferior interno; I2: inferior externo; P301S: ratones modificados genéticamente con el gen humano P301S; S1: superior interno; S2: superior externo; T1: temporal interno; T2: temporal externo.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 8. Valores medio de espesor, desviación estándar y análisis intergrupo en μm para ambos ojos de ratones P301S y NCAR a las 12, 24, 36 y 48 semanas para la capa nuclear externa.

CNE		12 semanas		24 semanas		36 semanas		48 semanas	
		Media ± sd	α	Media ± sd	α	Media ± sd	α	Media ± sd	α
N1	P301S	57,33 ± 10,44	0,09	59,25 ± 8,39	0,02	61,50 ± 11,01	0,22	66,50 ± 10,70	0,51
	NCAR	72,67 ± 18,28		72,83 ± 12,29		72,83 ± 14,55		70,00 ± 9,74	
N2	P301S	55,83 ± 8,89	0,1	61,00 ± 7,92	0,8	62,67 ± 6,21	0,7	64,60 ± 7,35	0,51
	NCAR	65,83 ± 9,54		62,33 ± 5,16		60,33 ± 7,61		61,17 ± 6,88	
S1	P301S	53,83 ± 13,79	0,03	58,42 ± 11,13	<0,01	67,08 ± 19,02	0,11	58,50 ± 10,60	0,02
	NCAR	80,67 ± 17,41		90,50 ± 24,44		85,17 ± 14,69		78,17 ± 19,94	
S2	P301S	46,17 ± 8,61	0,01	56,50 ± 8,51	0,03	62,50 ± 7,60	0,8	59,80 ± 7,50	0,58
	NCAR	68,67 ± 14,12		70,00 ± 13,01		65,33 ± 11,06		63,00 ± 3,29	
T1	P301S	52,00 ± 9,27	0,01	62,83 ± 8,12	<0,01	69,42 ± 10,87	0,73	69,20 ± 11,85	0,77
	NCAR	69,67 ± 7,31		75,50 ± 5,75		72,67 ± 10,09		68,00 ± 14,21	
T2	P301S	52,83 ± 11,05	0,38	59,83 ± 6,42	0,63	61,42 ± 7,79	0,9	62,20 ± 6,70	0,94
	NCAR	60,50 ± 3,73		62,17 ± 4,67		61,83 ± 5,46		62,17 ± 9,50	
I1	P301S	47,50 ± 12,76	0,14	52,42 ± 8,64	0,08	53,17 ± 8,21	0,28	55,70 ± 7,45	0,11
	NCAR	59,50 ± 8,76		61,00 ± 7,51		59,33 ± 11,54		62,50 ± 8,22	
I2	P301S	49,83 ± 6,27	0,01	54,83 ± 6,34	0,37	57,67 ± 7,13	>0,99	56,70 ± 6,43	0,25
	NCAR	61,17 ± 4,54		58,33 ± 7,87		59,33 ± 5,01		60,50 ± 5,72	

N1: nasal interno; N2: nasal externo; NCAR: ratones no portadores; I1: inferior interno; I2: inferior externo; P301S: ratones modificados genéticamente con el gen humano P301S; S1: superior interno; S2: superior externo; T1: temporal interno; T2: temporal externo.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 9. Valores medio de espesor, desviación estándar y análisis intergrupo en μm para ambos ojos de ratones P301S y NCAR a las 12, 24, 36 y 48 semanas para el epitelio pigmentario de la retina.

EPR		**12 semanas**		**24 semanas**		**36 semanas**		**48 semanas**	
		Media ± sd	α	Media ± sd	α	Media ± sd	α	Media ± sd	α
N1	P301S	17,33 ± 2,25	0,37	16,83 ±2,86	0,02	16,33 ± 0,89	0,2	17,40 ± 2,88	0,13
	NCAR	18,83 ± 2,99		20,50 ± 3,27		18,00 ± 2,28		21,33 ± 8,19	
N2	P301S	18,67 ± 2,25	0,22	20,17 ± 4,65	0,36	19,58 ±2,78	0,8	20,60 ± 3,78	0,32
	NCAR	20,50 ± 2,74		20,50 ± 2,59		19,83 ± 1,33		21,67 ± 2,16	
S1	P301S	16,17 ± 1,17	0,66	16,92 ± 1,51	0,66	18,08 ± 6,29	0,47	15,20 ± 1,48	0,06
	NCAR	17,17 ± 2,93		22,33 ± 11,72		19,17 ± 5,15		20,67 ± 7,15	
S2	P301S	19,17 ± 4,54	0,05	20,25 ± 4,88	0,02	20,00 ± 4,84	0,02	17,40 ± 3,06	<0,01
	NCAR	24,67 ± 5,72		27,00 ± 6,66		27,83 ± 4,92		28,83 ± 5,49	
T1	P301S	16,67 ± 1,37	0,06	15,67 ± 2,06	<0,01	15,67 ± 1,61	0,09	15,50 ± 1,08	<0,01
	NCAR	18,00 ± 1,10		19,67 ± 3,88		18,83 ± 4,88		20,83 ± 8,45	
T2	P301S	18,17 ± 2,40	0,83	18,25 ± 4,20	0,19	17,25 ± 2,09	0,23	17,20 ± 1,81	0,07
	NCAR	17,67 ± 1,21		19,67 ± 3,01		18,50 ± 1,87		20,83 ± 5,08	
I1	P301S	20,17 ± 4,96	0,85	17,67 ± 3,14	0,28	15,83 ± 2,17	0,07	18,70 ± 3,16	0,9
	NCAR	19,17 ± 2,71		18,67 ± 2,50		18,00 ± 3,69		20,67 ± 7,55	
I2	P301S	20,50 ± 4,04	0,68	20,75 ± 2,96	0,98	18,67 ± 5,45	0,13	21,60 ± 3,75	0,33
	NCAR	20,00 ± 1,79		20,83 ± 1,72		21,00 ± 2,97		23,83 ± 4,36	

N1: nasal interno; N2: nasal externo; NCAR: ratones no portadores; I1: inferior interno; I2: inferior externo; P301S: ratones modificados genéticamente con el gen humano P301S; S1: superior interno; S2: superior externo; T1: temporal interno; T2: temporal externo.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

CONCLUSIONES

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

CONCLUSIONES

En la presente Tesis Doctoral se han desarrollado y caracterizado, modelos animales de patologías oftálmicas y neurológicas mediante el uso de técnicas de imagen no invasivas como la tomografía de coherencia óptica y la tomografía de emisión de positrones, así como el uso de técnicas proteómicas. Se han descrito biomarcadores de imagen y proteicos que nos permiten plantear las siguientes conclusiones:

1. Por un lado, en la primera sección, se han caracterizado dos modelos animales de uveítis:

   1.1. El análisis y comparación de los dos modelos de uveítis experimental inducida ha proporcionado información útil acerca de los signos de la enfermedad en relación con la etiología de la misma. Así pues, se han caracterizado por medio de imagen y de marcadores proteicos los signos inflamatorios de una uveítis idiopática y una uveítis mediada por una inflamación sistémica.

   1.2. La inflamación provocada por la administración sistémica e intravítrea de lipopolisacárido provoca un cambio en la presión intraocular. En la comparación entre los modelos animales, la inducción intravítrea de la uveítis experimental inducida, la cual provoca un fenotipado similar a una uveítis idiopática, provoca un aumento de la presión intraocular debido a la acción combinada entre la inflamación causada por la endotoxina y la vía de administración. En cambio, al generar una uveítis mediada por una inflamación sistémica mediante la administración subcutánea de lipopolisacárido, la presión intraocular disminuye debido al posible aumento del flujo uveoesclerar.

   1.3. El tomógrafo de coherencia con el módulo de segmento anterior Spectralis® se presenta como una herramienta útil y no invasiva para la búsqueda de biomarcadores de imagen en el segmento anterior en modelos experimentales de uveítis. El estudio de los signos inflamatorios mediante el análisis por imagen del segmento anterior por tomografía de coherencia óptica ha proporcionado un análisis de los hallazgos oculares característicos de la enfermedad. Con todo ello, la administración de lipopolisacárido por vía

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

intravítrea proporciona mayor inflamación en cámara anterior que la administración sistémica.

1.4. La administración de lipopolisacárido por ambas vías de administración muestra una respuesta inflamatoria reflejada en los resultados de los análisis proteómicos. Estos muestran la presencia de proteínas proinflamatorias y específicas de la enfermedad de uveítis como es la catepsina G, el complemento C3 o la proteína S100A8. Comparando los hallazgos proteicos inflamatorios entre los dos modelos, la administración intravítrea de lipopolisacárido presenta una mayor expresión de proteínas proinflamatorias en el globo ocular.

1.5. Se ha realizado por primera vez un análisis y una comparativa mediante técnicas de tomografía de emisión de positrones combinada con tomografía computarizada en modelos de uveítis experimental inducida. Los estudios de tomografía de emisión de positrones combinados con tomografía computarizada con 18-Fluor-2-deoxi-2-d-glucosa muestran como el modelo inducido por vía intravítrea genera una mayor inflamación ocular. Además, el estudio de la captación de 18-Fluor-2-deoxi-2-d-glucosa en el resto de los órganos muestra una menor inflamación sistémica en el modelo de uveítis idiopática.

1.6. Tras la comparación de los signos entre el modelo inducido por vía sistémica y por vía intravítrea, se ha confirmado que el modelo intravítreo genera más inflamación local, simulando lo que sería una uveítis aguda idiopática. El modelo de uveítis experimental inducida por vía sistémica podría reproducir mejor las condiciones de una inflamación generalizada debido a que la inflamación afecta en mayor medida a otras partes del cuerpo.

2. Por otro lado, en la segunda parte de esta Tesis Doctoral se ha caracterizado un modelo animal de tauopatía:

2.1. El presente estudio ha proporcionado una caracterización longitudinal mediante técnicas de tomografía de coherencia óptica de los cambios retinianos en un modelo murino de tauopatía.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2.2. Se han observado mediante imagen infrarroja puntos hiperreflectivos en las retinas de los ratones a edades avanzadas en el modelo P301S. Estos puntos hiperreflectivos podrían ser inclusiones intracelulares de proteína tau fosforilada depositados en las capas más internas de la retina.

2.3. El análisis longitudinal de los cambios retinianos estructurales muestra que el modelo P301S presenta degeneración en las diferentes capas de la retina conforme avanza la edad de los animales. El estudio de las capas internas retinianas en el modelo P301S ha permitido mostrar la degeneración retiniana de la capa de fibras nerviosas de la retina en la zona peripapilar y de la retina total sobre todo en el cuadrante retiniano superior. A su vez, se han encontrado daños en la capa plexiforme interna, capa plexiforme externa y capa nuclear interna, las cuales están irrigadas por plexos vasculares dañados en el modelo animal y en pacientes con EA. El estudio del epitelio pigmentario de la retina y de la capa nuclear interna ha demostrado de igual manera el compromiso de la retina externa en el modelo P301S.

2.4. No se han observado cambios en la presión intraocular analizada en ninguno de los grupos, concluyendo que la disminución del espesor de la capa de fibras nerviosas de la retina en la zona peripapilar y su consecuente pérdida axonal del nervio óptico puede ser causa directa de la neurodegeración presente en el modelo animal.

2.5. El tomógrafo de coherencia óptica Spectralis® permite la obtención de imágenes *in vivo* de registros no invasivos longitudinales de patologías retinianas y neurodegenerativas. Los resultados muestran por primera vez un patrón de biomarcadores no invasivos de los espesores retinianos a diferentes tiempos de evolución de la enfermedad de Alzheimer en el modelo murino P301S, demostrando que Spectralis® OCT podría ser una herramienta útil para el seguimiento y evaluación de nuevas terapias contra la enfermedad de Alzheimer.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

CONCLUSIÓNS

Nesta Tese de Doutoramento desenvolvéronse e caracterizáronse modelos animais de patoloxías oftálmicas e neurolóxicas mediante o uso de técnicas de imaxe non invasivas como a tomografía de coherencia óptica e a tomografía por emisión de positróns, así como a utilización de técnicas proteómicas. Describíronse biomarcadores e proteínas de imaxe que permiten extraer as seguintes conclusións: Por unha banda, na primeira parte na que se caracterizaron modelos animais de uveíte, pódese concluír:

1. Por unha banda, no primeiro apartado caracterízanse dous modelos animais de uveíte:

   1.1. A análise e comparación dos dous modelos de uveíte inducida experimentalmente proporcionou información útil sobre os signos da enfermidade en relación coa súa etioloxía. Así, os signos inflamatorios da uveíte idiopática e da uveíte mediada pola inflamación sistémica caracterizáronse mediante imaxes e marcadores proteicos.

   1.2. A inflamación causada pola administración sistémica e intravítrea de lipopolisacáridos provoca un cambio na presión intraocular. Na comparación entre modelos animais, a indución intravítrea de uveíte inducida experimentalmente, que provoca un fenotipado similar á uveíte idiopática, provoca un aumento da presión intraocular debido á acción combinada entre a inflamación provocada pola endotoxina e a de administración. Por outra banda, ao xerar uveíte mediada pola inflamación sistémica mediante a administración subcutánea de lipopolisacáridos, a presión intraocular diminúe debido ao posible aumento do fluxo uveoescleral.

   1.3. O tomógrafo de coherencia co módulo de segmento anterior Spectralis® preséntase como unha ferramenta útil e non invasiva para a busca de biomarcadores de imaxe no segmento anterior en modelos experimentais de uveíte. O estudo dos signos inflamatorios mediante a análise de imaxes do segmento anterior mediante tomografía de coherencia óptica proporcionou unha análise dos achados oculares característicos da enfermidade. Con todo

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

isto, a administración intravítrea de lipopolisacáridos proporciona unha maior inflamación na cámara anterior que a administración sistémica.

1.4. A administración de lipopolisacáridos por ambas vías de administración mostra unha resposta inflamatoria reflectida nos resultados das análises proteómicas. Estes mostran a presenza de proteínas proinflamatorias e específicas da enfermidade da uveíte como a catepsina G, o complemento C3 ou a proteína S100A8. Comparando os achados de proteínas inflamatorias entre os dous modelos, a administración intravítrea de lipopolisacáridos presenta unha maior expresión de proteínas proinflamatorias no globo ocular.

1.5. Realizouse por primeira vez unha análise e comparación mediante técnicas de tomografía por emisión de positróns combinadas coa tomografía computarizada en modelos de uveíte inducida experimentalmente. Os estudos de tomografía por emisión de positróns combinados coa tomografía computarizada con 18-fluor-2-desoxi-2-d-glicosa mostran como o modelo inducido por intravítreo xera unha maior inflamación ocular. Ademais, o estudo da captación de 18-Fluor-2-desoxi-2-d-glicosa no resto de órganos mostra unha menor inflamación sistémica no modelo de uveíte idiopática.

1.6. Tras comparar os signos entre o modelo inducido pola vía sistémica e pola vía intravítrea, confirmouse que o modelo intravítreo xera máis inflamación local, simulando o que sería unha uveíte aguda idiopática. O modelo experimental de uveíte inducida sistémicamente podería reproducir mellor as condicións de inflamación xeneralizada porque a inflamación afecta a outras partes do corpo en maior medida.

2. Por outra banda, na segunda parte desta Tese Doutoral caracterizouse un modelo animal de tauopatía:

2.1. O presente estudo proporcionou unha caracterización lonxitudinal mediante técnicas de tomografía de coherencia óptica dos cambios da retina nun modelo murino de tauopatía.

2.2. Observáronse puntos hiperreflectantes mediante imaxes infravermellas na retina de ratos a idades avanzadas no modelo P301S. Estas manchas

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

hiperreflexivas poderían ser inclusións intracelulares de proteína tau fosforilada depositada nas capas máis internas da retina.

2.3. A análise lonxitudinal dos cambios estruturais da retina mostra que o modelo P301S presenta dexeneración nas diferentes capas da retina a medida que os animais envellecen. O estudo das capas internas da retina no modelo P301S mostrou a dexeneración da retina da capa de fibras nerviosas da retina na zona peripapilar e da retina total, especialmente no cuadrante superior da retina. Pola súa banda, atopáronse danos na capa plexiforme interna, na capa plexiforme externa e na capa nuclear interna, que son subministradas por plexos vasculares danados no modelo animal e en pacientes con EA. O estudo do epitelio pigmentario da retina e da capa nuclear interna demostrou de xeito similar a implicación da retina externa no modelo P301S.

2.4. Non se observaron cambios na presión intraocular analizada en ningún dos grupos, chegando á conclusión de que a diminución do grosor da capa de fibras nerviosas da retina na zona peripapilar e a súa consecuente perda axonal do nervio óptico pode ser unha causa directa da neurodexeración no modelo animal.

2.5. O tomógrafo de coherencia óptica Spectralis® permite a obtención de imaxes in vivo de rexistros lonxitudinais non invasivos de patoloxías retinianas e neurodexenerativas. Os resultados mostran por primeira vez un patrón de biomarcadores de grosor retiniano non invasivos en diferentes momentos de evolución da enfermidade de Alzheimer no modelo murino P301S, demostrando que Spectralis® OCT podería ser unha ferramenta útil para o seguimento e avaliación de novas terapias contra o Alzheimer. enfermidade.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

CONCLUSIONS

In this Doctoral Thesis, animal models of ophthalmic and neurological pathologies have been developed and characterized using non-invasive imaging techniques such as optical coherence tomography and positron emission tomography, as well as the use of proteomic techniques. Imaging and proteomic biomarkers have been described that allow us to draw the following conclusions:

1. On the one hand, in the first section, two animal models of uveitis have been characterized:

   1.1. The analysis and comparison of the two models of experimental induced uveitis has provided useful information about the signs of the disease in relation to the etiology of the disease. Thus, the inflammatory signs of idiopathic uveitis and uveitis mediated by systemic inflammation have been characterized by imaging and protein markers.

   1.2. Inflammation caused by systemic and intravitreal administration of lipopolysaccharide causes a change in intraocular pressure. In the comparison between animal models, intravitreal induction of experimental induced uveitis, which causes a phenotyping similar to idiopathic uveitis, causes an increase in intraocular pressure due to the combined action between the inflammation caused by the endotoxin and the route of administration. In contrast, when generating a systemic inflammation-mediated uveitis by subcutaneous administration of lipopolysaccharide, intraocular pressure decreases due to the possible increase in uveoscleral flow.

   1.3. Coherence tomography with the anterior segment module Spectralis® is presented as a useful and non-invasive tool for the search of imaging biomarkers in the anterior segment in experimental models of uveitis. The study of inflammatory signs by anterior segment imaging analysis by optical coherence tomography has provided an analysis of ocular findings characteristic of the disease. All in all, intravitreal administration of lipopolysaccharide provides greater anterior chamber inflammation than systemic administration.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.4. The administration of lipopolysaccharide by both routes of administration shows an inflammatory response reflected in the results of proteomic analysis. These show the presence of proinflammatory and uveitis disease-specific proteins such as cathepsin G, complement C3 or S100A8 protein. Comparing the inflammatory protein findings between the two models, intravitreal administration of lipopolysaccharide shows a higher expression of proinflammatory proteins in the eyeball.

1.5. An analysis and comparison using positron emission tomography techniques combined with computed tomography has been performed for the first time in models of experimental induced uveitis. Positron emission tomography studies combined with 18-Fluor-2-deoxy-2-d-glucose computed tomography show how the intravitreal-induced model generates greater ocular inflammation. In addition, the study of 18-Fluor-2-deoxy-2-d-glucose uptake in the rest of the organs shows less systemic inflammation in the idiopathic uveitis model.

1.6. After comparing the signs between the systemically and intravitreal induced model, it has been confirmed that the intravitreal model generates more local inflammation, simulating what would be an acute idiopathic uveitis. The systemically induced experimental uveitis model could better reproduce the conditions of generalized inflammation because the inflammation affects other parts of the body to a greater extent.

2. On the other hand, in the second part of this Doctoral Thesis, an animal model of tauopathy has been characterized:

2.1. The present study has provided a longitudinal characterization by optical coherence tomography techniques of retinal changes in a murine model of tauopathy.

2.2. Hyperreflective spots have been observed by infrared imaging in the retinas of mice at advanced ages in the P301S model. These hyperreflective spots could be intracellular inclusions of phosphorylated tau protein deposited in the innermost layers of the retina.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2.3. Longitudinal analysis of structural retinal changes shows that the P301S model shows degeneration in the different retinal layers as the animals age. The study of the inner retinal layers in the P301S model has shown retinal degeneration of the retinal nerve fiber layer in the peripapillary zone and of the total retina, especially in the superior retinal quadrant. In turn, damage has been found in the inner plexiform layer, outer plexiform layer and inner nuclear layer, which are supplied by damaged vascular plexuses in the animal model and in patients with AD. The study of the retinal pigment epithelium and the inner nuclear layer has similarly demonstrated involvement of the outer retina in the P301S model.

2.4. No changes in the intraocular pressure analyzed were observed in any of the groups, concluding that the decrease in the thickness of the retinal nerve fiber layer in the peripapillary zone and its consequent axonal loss of the optic nerve may be a direct cause of the neurodegeneration present in the animal model.

2.5. Optical coherence tomography Spectralis® allows in vivo imaging of longitudinal noninvasive recordings of retinal and neurodegenerative pathologies. The results show for the first time a pattern of non-invasive retinal thickness biomarkers at different times of evolution of Alzheimer's disease in the P301S murine model, demonstrating that Spectralis® OCT could be a useful tool for the monitoring and evaluation of new therapies against Alzheimer's disease.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

BIBLIOGRAFÍA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

BIBLIOGRAFÍA

1. Kels BD, Grzybowski A, Grant-Kels JM. Human ocular anatomy. Clin Dermatol. 1 de marzo de 2015;33(2):140-6.

2. Jonas JB, Jonas RA, Bikbov MM, Wang YX, Panda-Jonas S. Myopia: Histology, clinical features, and potential implications for the etiology of axial elongation. Prog Retin Eye Res. septiembre de 2023;96:101156.

3. Vezina M. Comparative Ocular Anatomy in Commonly Used Laboratory Animals. En 2012. p. 1-21.

4. Sridhar MS. Anatomy of cornea and ocular surface. Indian J Ophthalmol. febrero de 2018;66(2):190-4.

5. Thomasy SM, Eaton JS, Timberlake MJ, Miller PE, Matsumoto S, Murphy CJ. Species Differences in the Geometry of the Anterior Segment Differentially Affect Anterior Chamber Cell Scoring Systems in Laboratory Animals. J Ocul Pharmacol Ther. 1 de enero de 2016;32(1):28-37.

6. Maynard RL, Downes N. Anatomy and histology of the laboratory rat in toxicology and biomedical research. 2019. 1 p. (Anatomy and Histology of the Laboratory Rat in Toxicology and Biomedical Research).

7. Lucas Ruiz F. Estudio de la degeneración de las células ganglionares de la retina tras axotomía del nervio óptico : ensayo de nuevas terapias celulares y farmacológicas. Proy Investig [Internet]. 13 de enero de 2020 [citado 2 de septiembre de 2021]; Disponible en: https://digitum.um.es/digitum/handle/10201/85399

8. Hughes A. A schematic eye for the rat. Vision Res. 1979;19(5):569-88.

9. Van Cruchten S, Vrolyk V, Perron Lepage MF, Baudon M, Voute H, Schoofs S, et al. Pre- and Postnatal Development of the Eye: A Species Comparison. Birth Defects Res. 15 de noviembre de 2017;109(19):1540-67.

10. Parr T, Friston KJ. The active construction of the visual world. Neuropsychologia. septiembre de 2017;104:92-101.

USC DE COMPOSTELA

11.Schmidt CH, Volpe NJ, Bryar PJ. Eye Disease in Medical Practice: What You Should Know and Why You Should Know It. Med Clin North Am. mayo de 2021;105(3):397-407.

12.Flaxman SR, Bourne RRA, Resnikoff S, Ackland P, Braithwaite T, Cicinelli MV, et al. Global causes of blindness and distance vision impairment 1990-2020: a systematic review and meta-analysis. Lancet Glob Health. diciembre de 2017;5(12):e1221-34.

13.Robinson NB, Krieger K, Khan FM, Huffman W, Chang M, Naik A, et al. The current state of animal models in research: A review. Int J Surg Lond Engl. diciembre de 2019;72:9-13.

14.Ministerio de la Presidencia, Relaciones con las Cortes y Memoria Democrática. Real Decreto 118/2021, de 23 de febrero, por el que se modifica el Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia [Internet]. Sec. 1, Real Decreto 118/2021 feb 24, 2021 p. 22616-8. Disponible en: https://www.boe.es/eli/es/rd/2021/02/23/118

15.Burden N, Chapman K, Sewell F, Robinson V. Pioneering better science through the 3Rs: an introduction to the national centre for the replacement, refinement, and reduction of animals in research (NC3Rs). J Am Assoc Lab Anim Sci JAALAS. marzo de 2015;54(2):198-208.

16.Shinomiya K, Ueta M, Kinoshita S. A new dry eye mouse model produced by exorbital and intraorbital lacrimal gland excision. Sci Rep. 24 de enero de 2018;8(1):1483.

17.Rosenbaum JT, McDevitt HO, Guss RB, Egbert PR. Endotoxin-induced uveitis in rats as a model for human disease. Nature. 7 de agosto de 1980;286(5773):611-3.

18.Kern TS, Engerman RL. Galactose-induced retinal microangiopathy in rats. Invest Ophthalmol Vis Sci. febrero de 1995;36(2):490-6.

19.Dursun D, Wang M, Monroy D, Li DQ, Lokeshwar BL, Stern ME, et al. A mouse model of keratoconjunctivitis sicca. Invest Ophthalmol Vis Sci. marzo de 2002;43(3):632-8.

20.Zoukhri D, Kublin CL. Impaired Neurotransmitter Release from Lacrimal and

Salivary Gland Nerves of a Murine Model of Sjögren's Syndrome. Invest Ophthalmol Vis Sci. abril de 2001;42(5):925-32.

21. John SW, Smith RS, Savinova OV, Hawes NL, Chang B, Turnbull D, et al. Essential iris atrophy, pigment dispersion, and glaucoma in DBA/2J mice. Invest Ophthalmol Vis Sci. mayo de 1998;39(6):951-62.

22. Wang HH, Chen WY, Huang YH, Hsu SM, Tsao YP, Hsu YH, et al. Interleukin-20 is involved in dry eye disease and is a potential therapeutic target. J Biomed Sci. 9 de junio de 2022;29(1):36.

23. Yang S, Li T, Jia H, Gao M, Li Y, Wan X, et al. Targeting C3b/C4b and VEGF with a bispecific fusion protein optimized for neovascular age-related macular degeneration therapy. Sci Transl Med. junio de 2022;14(647):eabj2177.

24. Amin SM, Gonzalez A, Guevara J, Bolch C, Andersen L, Smith WC, et al. Efficacy of Aflibercept Treatment and Its Effect on the Retinal Perfusion in the Oxygen-Induced Retinopathy Mouse Model of Retinopathy of Prematurity. Ophthalmic Res. 2021;64(1):91-8.

25. Lin X, Wu Y, Tang L, Ouyang W, Yang Y, Liu Z, et al. Comparison of Treatment Effect and Tolerance of the Topical Application of Mizoribine and Cyclosporine A in a Mouse Dry Eye Model. Transl Vis Sci Technol. diciembre de 2020;9(13):22.

26. Yun SP, Kam TI, Panicker N, Kim S, Oh Y, Park JS, et al. Block of A1 astrocyte conversion by microglia is neuroprotective in models of Parkinson's disease. Nat Med. julio de 2018;24(7):931-8.

27. Yu Z, Wen Y, Jiang N, Li Z, Guan J, Zhang Y, et al. TNF-α stimulation enhances the neuroprotective effects of gingival MSCs derived exosomes in retinal ischemia-reperfusion injury via the MEG3/miR-21a-5p axis. Biomaterials. mayo de 2022;284:121484.

28. Zhang X, Shahani U, Reilly J, Shu X. Disease mechanisms and neuroprotection by tauroursodeoxycholic acid in Rpgr knockout mice. J Cell Physiol. agosto de 2019;234(10):18801-12.

29. Prokosch V, Schallenberg M, Thanos S. Crystallins are regulated biomarkers for monitoring topical therapy of glaucomatous optic neuropathy. PloS One.

2013;8(2):e49730.

30.Zeiss CJ. Translational models of ocular disease. Vet Ophthalmol. julio de 2013;16 Suppl 1:15-33.

31.van Zyl T, Yan W, McAdams AM, Monavarfeshani A, Hageman GS, Sanes JR. Cell atlas of the human ocular anterior segment: Tissue-specific and shared cell types. Proc Natl Acad Sci U S A. 19 de julio de 2022;119(29):e2200914119.

32.Gipson IK. The Ocular Surface: The Challenge to Enable and Protect Vision. Invest Ophthalmol Vis Sci. octubre de 2007;48(10):4390-8.

33.Tham YC, Li X, Wong TY, Quigley HA, Aung T, Cheng CY. Global prevalence of glaucoma and projections of glaucoma burden through 2040: a systematic review and meta-analysis. Ophthalmology. noviembre de 2014;121(11):2081-90.

34.Soriano V, Javier F. Caracterizacion en roedores adultos de la población de células ganglionares de retina melanopsínicas y estudio de la degeneración de las células ganglionares tras hipertensión ocular y neuroprotección. Proy Investig [Internet]. 2 de julio de 2015 [citado 2 de agosto de 2021]; Disponible en: https://digitum.um.es/digitum/handle/10201/45558

35.Biswas S, Wan KH. Review of rodent hypertensive glaucoma models. Acta Ophthalmol (Copenh). 2019;97(3):e331-40.

36.Nishigori H. [Steroid (glucocorticoid)-induced cataract]. Yakugaku Zasshi. octubre de 2006;126(10):869-84.

37.Shearer TR, David LL, Anderson RS, Azuma M. Review of selenite cataract. Curr Eye Res. abril de 1992;11(4):357-69.

38.Caixinha M, Santos J, Santos M, Nunes S. Animal model for in-vivo Nuclear Cataract. Lens hardness and elasticity assessment. J Mech Behav Biomed Mater. 2 de junio de 2024;157:106610.

39.Choi JI, Kim J, Choung SY. Polyphenol-enriched fraction of Vaccinium uliginosum L. protects selenite-induced cataract formation in the lens of Sprague-Dawley rat pups. Mol Vis. 2019;25:118-28.

40.Asha R, Gayathri Devi V, Abraham A. Lupeol, a pentacyclic triterpenoid isolated

from Vernonia cinerea attenuate selenite induced cataract formation in Sprague Dawley rat pups. Chem Biol Interact. 5 de febrero de 2016;245:20-9.

41. Lee SM, Jeong EM, Jeong J, Shin DM, Lee HJ, Kim HJ, et al. Cysteamine prevents the development of lens opacity in a rat model of selenite-induced cataract. Invest Ophthalmol Vis Sci. 15 de marzo de 2012;53(3):1452-9.

42. Doganay S, Borazan M, Iraz M, Cigremis Y. The effect of resveratrol in experimental cataract model formed by sodium selenite. Curr Eye Res. febrero de 2006;31(2):147-53.

43. Lu TH, Chang JW, Jhou BY, Hsu JH, Li TJ, Lee LY, et al. Preventative Effects of Cordyceps cicadae Mycelial Extracts on the Early-Stage Development of Cataracts in UVB-Induced Mice Cataract Model. Nutrients. 11 de julio de 2023;15(14):3103.

44. Wei Z, Hao C, Srinivasagan R, Wu H, Chen JK, Fan X. Mitotic Activation Around Wound Edges and Epithelialization Repair in UVB-Induced Capsular Cataracts. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1 de diciembre de 2021;62(15):29.

45. Guo Y, Guo C, Zhang J, Ning X, Yan H. The protective mechanism of Grx2 in ultraviolet-B (UVB)-induced cataract formation. Biochem Biophys Res Commun. 12 de julio de 2022;613:107-12.

46. Craig JP, Nichols KK, Akpek EK, Caffery B, Dua HS, Joo CK, et al. TFOS DEWS II Definition and Classification Report. Ocul Surf. julio de 2017;15(3):276-83.

47. Stern ME, Pflugfelder SC. What We Have Learned From Animal Models of Dry Eye. Int Ophthalmol Clin. 2017;57(2):109-18.

48. Li X, Kang B, Woo IH, Eom Y, Lee HK, Kim HM, et al. Effects of Topical Mucolytic Agents on the Tears and Ocular Surface: A Plausible Animal Model of Mucin-Deficient Dry Eye. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1 de junio de 2018;59(7):3104-14.

49. Park JH, Moon SH, Kang DH, Um HJ, Kang SS, Kim JY, et al. Diquafosol Sodium Inhibits Apoptosis and Inflammation of Corneal Epithelial Cells Via Activation of Erk1/2 and RSK: In Vitro and In Vivo Dry Eye Model. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1 de octubre de 2018;59(12):5108-15.

50. Chang YA, Wu YY, Lin CT, Kawasumi M, Wu CH, Kao SY, et al. Animal models of

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

dry eye: Their strengths and limitations for studying human dry eye disease. J Chin Med Assoc JCMA. 1 de mayo de 2021;84(5):459-64.

51. de Paiva CS. Effects of Aging in Dry Eye. Int Ophthalmol Clin. 2017;57(2):47-64.

52. Thacker M, Sahoo A, Reddy AA, Bokara KK, Singh S, Basu S, et al. Benzalkonium chloride-induced dry eye disease animal models: Current understanding and potential for translational research. Indian J Ophthalmol. abril de 2023;71(4):1256-62.

53. She Y, Li J, Xiao B, Lu H, Liu H, Simmons PA, et al. Evaluation of a Novel Artificial Tear in the Prevention and Treatment of Dry Eye in an Animal Model. J Ocul Pharmacol Ther Off J Assoc Ocul Pharmacol Ther. noviembre de 2015;31(9):525-30.

54. Mérida S, Palacios E, Navea A, Bosch-Morell F. Macrophages and Uveitis in Experimental Animal Models. Mediators Inflamm. 2015;2015:671417.

55. Agarwal RK, Silver PB, Caspi RR. Rodent Models of Experimental Autoimmune Uveitis. Methods Mol Biol Clifton NJ. 2012;900:10.1007/978-1-60761-720-4_22.

56. Roberge FG, Lorberboum-Galski H, Le Hoang P, de Smet M, Chan CC, Fitzgerald D, et al. Selective immunosuppression of activated T cells with the chimeric toxin IL-2-PE40. Inhibition of experimental autoimmune uveoretinitis. J Immunol Baltim Md 1950. 1 de diciembre de 1989;143(11):3498-502.

57. Pathology of experimental autoimmune uveoretinitis in mice - PubMed [Internet]. [citado 8 de julio de 2024]. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2397018/

58. Smith JR, Rosenbaum JT, Williams KA. Experimental melanin-induced uveitis: experimental model of human acute anterior uveitis. Ophthalmic Res. 2008;40(3-4):136-40.

59. Pepple KL, Rotkis L, Van Grol J, Wilson L, Sandt A, Lam DL, et al. Primed Mycobacterial Uveitis (PMU): Histologic and Cytokine Characterization of a Model of Uveitis in Rats. Invest Ophthalmol Vis Sci. diciembre de 2015;56(13):8438-48.

60. John S, Bell OH, Wilson L, Copland DA, Pepple KL. Primed Mycobacterial Uveitis (PMU) as a Model for Post-Infectious Uveitis. J Vis Exp JoVE. 17 de diciembre de

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2021;(178):10.3791/62925.

61.Bansal S, Barathi VA, Iwata D, Agrawal R. Experimental autoimmune uveitis and other animal models of uveitis: An update. Indian J Ophthalmol. marzo de 2015;63(3):211-8.

62.Yadav UCS, Ramana KV. Endotoxin-Induced Uveitis in Rodents. Methods Mol Biol Clifton NJ. 2019;1960:161-8.

63.Lechner J, O'Leary OE, Stitt AW. The pathology associated with diabetic retinopathy. Vision Res. 1 de octubre de 2017;139:7-14.

64.Olivares AM, Althoff K, Chen GF, Wu S, Morrisson MA, DeAngelis MM, et al. Animal Models of Diabetic Retinopathy. Curr Diab Rep. 2017;17(10):93.

65.Janapati YK, Junapudi S. Progress in experimental models to investigate the in vivo and in vitro antidiabetic activity of drugs. Anim Models Exp Med. junio de 2024;7(3):297-309.

66.Rakieten N, Rakieten ML, Nadkarni MV. Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917). Cancer Chemother Rep. mayo de 1963;29:91-8.

67.Xie Z, Wu XJ, Cheng RW, Cui JH, Yuan ST, Zhou JW, et al. JP1, a polypeptide specifically targeting integrin αVβ3, ameliorates choroidal neovascularization and diabetic retinopathy in mice. Acta Pharmacol Sin. abril de 2023;44(4):897-912.

68.Goodman D, Ness S. The Role of Oxidative Stress in the Aging Eye. Life. 20 de marzo de 2023;13(3):837.

69.Fletcher EL, Jobling AI, Greferath U, Mills SA, Waugh M, Ho T, et al. Studying age-related macular degeneration using animal models. Optom Vis Sci Off Publ Am Acad Optom. agosto de 2014;91(8):878-86.

70.Abokyi S, To CH, Lam TT, Tse DY. Central Role of Oxidative Stress in Age-Related Macular Degeneration: Evidence from a Review of the Molecular Mechanisms and Animal Models. Oxid Med Cell Longev. 2020;2020:7901270.

71.Regula JT, Lundh von Leithner P, Foxton R, Barathi VA, Cheung CMG, Bo Tun SB, et al. Targeting key angiogenic pathways with a bispecific CrossMAb optimized for neovascular eye diseases. EMBO Mol Med. noviembre de 2016;8(11):1265-88.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

72.Ibuki M, Lee D, Shinojima A, Miwa Y, Tsubota K, Kurihara T. Rice Bran and Vitamin B6 Suppress Pathological Neovascularization in a Murine Model of Age-Related Macular Degeneration as Novel HIF Inhibitors. Int J Mol Sci. 25 de noviembre de 2020;21(23):8940.

73.Yap TE, Balendra SI, Almonte MT, Cordeiro MF. Retinal correlates of neurological disorders. Ther Adv Chronic Dis. 2 de diciembre de 2019;10:2040622319882205.

74.Kumar A, Singh A, Ekavali null. A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update. Pharmacol Rep PR. abril de 2015;67(2):195-203.

75.Is the Eye an Extension of the Brain in Central Nervous System Disease? - PubMed [Internet]. [citado 15 de julio de 2024]. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28609158/

76.Axonal loss in multiple sclerosis: causes and mechanisms - PubMed [Internet]. [citado 12 de julio de 2024]. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24507515/

77.Shin T, Ahn M, Kim J, Jung K, Moon C, Kim MD. Visual Dysfunction in Multiple Sclerosis and its Animal Model, Experimental Autoimmune Encephalomyelitis: a Review. Mol Neurobiol. 1 de julio de 2021;58(7):3484-93.

78.Shields DC, Tyor WR, Deibler GE, Banik NL. Increased calpain expression in experimental demyelinating optic neuritis: an immunocytochemical study. Brain Res. 16 de febrero de 1998;784(1):299-304.

79.2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphohydrolase activity in rat visual pathways with experimental allergic encephalomyelitis - PubMed [Internet]. [citado 12 de julio de 2024]. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3014190/

80.Manogaran P, Samardzija M, Schad AN, Wicki CA, Walker-Egger C, Rudin M, et al. Retinal pathology in experimental optic neuritis is characterized by retrograde degeneration and gliosis. Acta Neuropathol Commun. 17 de julio de 2019;7(1):116.

81.Williams SK, Fairless R, Maier O, Liermann PC, Pichi K, Fischer R, et al. Anti-TNFR1 targeting in humanized mice ameliorates disease in a model of multiple sclerosis. Sci Rep. 11 de septiembre de 2018;8:13628.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

82.Fiedler T, Fairless R, Pichi K, Fischer R, Richter F, Kontermann RE, et al. Co-modulation of TNFR1 and TNFR2 in an animal model of multiple sclerosis. J Neuroinflammation. 30 de abril de 2023;20:100.

83.Liu F, Alfarhan M, Baker L, Shenoy N, Liao Y, Henry-Ojo HO, et al. Treatment with MDL 72527 Ameliorated Clinical Symptoms, Retinal Ganglion Cell Loss, Optic Nerve Inflammation, and Improved Visual Acuity in an Experimental Model of Multiple Sclerosis. Cells. 16 de diciembre de 2022;11(24):4100.

84.Dal Monte M, Cammalleri M, Locri F, Amato R, Marsili S, Rusciano D, et al. Fatty Acids Dietary Supplements Exert Anti-Inflammatory Action and Limit Ganglion Cell Degeneration in the Retina of the EAE Mouse Model of Multiple Sclerosis. Nutrients. 8 de marzo de 2018;10(3):325.

85.Armstrong MJ, Okun MS. Diagnosis and Treatment of Parkinson Disease: A Review. JAMA. 11 de febrero de 2020;323(6):548-60.

86.Alves JN, Westner BU, Højlund A, Weil RS, Dalal SS. Structural and functional changes in the retina in Parkinson's disease. J Neurol Neurosurg Psychiatry. junio de 2023;94(6):448-56.

87.Veys L, Vandenabeele M, Ortuño-Lizarán I, Baekelandt V, Cuenca N, Moons L, et al. Retinal α-synuclein deposits in Parkinson's disease patients and animal models. Acta Neuropathol (Berl). marzo de 2019;137(3):379-95.

88.Bioelectrical function and structural assessment of the retina in patients with early stages of Parkinson's disease (PD) | Documenta Ophthalmologica [Internet]. [citado 15 de julio de 2024]. Disponible en: https://link.springer.com/article/10.1007/s10633-015-9503-0

89.Normando EM, Davis BM, De Groef L, Nizari S, Turner LA, Ravindran N, et al. The retina as an early biomarker of neurodegeneration in a rotenone-induced model of Parkinson's disease: evidence for a neuroprotective effect of rosiglitazone in the eye and brain. Acta Neuropathol Commun. 18 de agosto de 2016;4:86.

90.Esteve-Rudd J, Fernández-Sánchez L, Lax P, De Juan E, Martín-Nieto J, Cuenca N. Rotenone induces degeneration of photoreceptors and impairs the dopaminergic system in the rat retina. Neurobiol Dis. octubre de 2011;44(1):102-15.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

91.Longitudinal live imaging of retinal α-synuclein::GFP deposits in a transgenic mouse model of Parkinson's Disease/Dementia with Lewy Bodies | Scientific Reports [Internet]. [citado 15 de julio de 2024]. Disponible en: https://www.nature.com/articles/srep29523

92.Zhou H, Su J, Hu X, Zhou C, Li H, Chen Z, et al. Glia-to-Neuron Conversion by CRISPR-CasRx Alleviates Symptoms of Neurological Disease in Mice. Cell. 30 de abril de 2020;181(3):590-603.e16.

93.Kkn T, Vhy W, Jkh L, A S, A H, Di F, et al. Characterization of retinal function and structure in the MPTP murine model of Parkinson's disease. Sci Rep [Internet]. 5 de septiembre de 2022 [citado 15 de julio de 2024];12(1). Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35534594/

94.N M, T B, J V, Jj G, Mhw G. Retina as a Model to Study In Vivo Transmission of α-Synuclein in the A53T Mouse Model of Parkinson's Disease. Methods Mol Biol Clifton NJ [Internet]. 2021 [citado 15 de julio de 2024];2224. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33606207/

95.Rojas JC, Saavedra JA, Gonzalez-Lima F. Neuroprotective effects of memantine in a mouse model of retinal degeneration induced by rotenone. Brain Res. 18 de junio de 2008;1215:208-17.

96.Kametani F, Hasegawa M. Reconsideration of Amyloid Hypothesis and Tau Hypothesis in Alzheimer's Disease. Front Neurosci. 30 de enero de 2018;12:25.

97.Klyucherev TO, Olszewski P, Shalimova AA, Chubarev VN, Tarasov VV, Attwood MM, et al. Advances in the development of new biomarkers for Alzheimer's disease. Transl Neurodegener. 21 de abril de 2022;11:25.

98.Chen ZY, Zhang Y. Animal models of Alzheimer's disease: Applications, evaluation, and perspectives. Zool Res. 18 de noviembre de 2022;43(6):1026-40.

99.Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse - PubMed [Internet]. [citado 15 de julio de 2024]. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10408445/

100.Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kayed R, et al. Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular

Abeta and synaptic dysfunction. Neuron. 31 de julio de 2003;39(3):409-21.

101.Holtzman DM, Bales KR, Wu S, Bhat P, Parsadanian M, Fagan AM, et al. Expression of human apolipoprotein E reduces amyloid-β deposition in a mouse model of Alzheimer's disease. J Clin Invest. 15 de marzo de 1999;103(6):R15-21.

102.Oakley H, Cole SL, Logan S, Maus E, Shao P, Craft J, et al. Intraneuronal β-Amyloid Aggregates, Neurodegeneration, and Neuron Loss in Transgenic Mice with Five Familial Alzheimer's Disease Mutations: Potential Factors in Amyloid Plaque Formation. J Neurosci. 4 de octubre de 2006;26(40):10129-40.

103.Aumann S, Donner S, Fischer J, Müller F. Optical Coherence Tomography (OCT): Principle and Technical Realization. En: Bille JF, editor. High Resolution Imaging in Microscopy and Ophthalmology [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2019 [citado 10 de agosto de 2021]. p. 59-85. Disponible en: http://link.springer.com/10.1007/978-3-030-16638-0_3

104.Reddy AK, Cabrera M, Yeh S, Davis JL, Albini TA. Optical coherence tomography-guided ranibizumab injection for cystoid macular edema in well-controlled uveitis: twelve-month outcomes. Retina Phila Pa. diciembre de 2014;34(12):2431-8.

105.Invernizzi A, Cozzi M, Staurenghi G. Optical coherence tomography and optical coherence tomography angiography in uveitis: A review. Clin Experiment Ophthalmol. abril de 2019;47(3):357-71.

106.van Velthoven MEJ, Faber DJ, Verbraak FD, van Leeuwen TG, de Smet MD. Recent developments in optical coherence tomography for imaging the retina. Prog Retin Eye Res. enero de 2007;26(1):57-77.

107.Zeppieri M, Marsili S, Enaholo ES, Shuaibu AO, Uwagboe N, Salati C, et al. Optical Coherence Tomography (OCT): A Brief Look at the Uses and Technological Evolution of Ophthalmology. Med Kaunas Lith. 3 de diciembre de 2023;59(12):2114.

108.Walther J, Gaertner M, Cimalla P, Burkhardt A, Kirsten L, Meissner S, et al. Optical coherence tomography in biomedical research. Anal Bioanal Chem. julio de 2011;400(9):2721-43.

109.Fercher AF, Drexler W, Hitzenberger CK, Lasser T. Optical coherence tomography - principles and applications. Rep Prog Phys. enero de 2003;66(2):239.

110.Ladino AFP. Tomografía de coherencia óptica (OCT), para segmento anterior. :71.

111.Zhou KC, Qian R, Degan S, Farsiu S, Izatt JA. Optical coherence refraction tomography. Nat Photonics. noviembre de 2019;13(11):794-802.

112.Fercher AF, Hitzenberger CK, Kamp G, El-Zaiat SY. Measurement of intraocular distances by backscattering spectral interferometry. Opt Commun. 15 de mayo de 1995;117(1):43-8.

113.Swanson EA, Izatt JA, Hee MR, Huang D, Lin CP, Schuman JS, et al. In vivo retinal imaging by optical coherence tomography. Opt Lett. 1 de noviembre de 1993;18(21):1864-6.

114.Fercher AF, Hitzenberger CK, Drexler W, Kamp G, Sattmann H. In vivo optical coherence tomography. Am J Ophthalmol. 15 de julio de 1993;116(1):113-4.

115.Fujimoto J, Swanson E. The Development, Commercialization, and Impact of Optical Coherence Tomography. Invest Ophthalmol Vis Sci. julio de 2016;57(9):OCT1-13.

116.Coscas G, Lupidi M, Coscas F. Heidelberg Spectralis Optical Coherence Tomography Angiography: Technical Aspects. Dev Ophthalmol. 2016;56:1-5.

117.Li Q, Timmers AM, Hunter K, Gonzalez-Pola C, Lewin AS, Reitze DH, et al. Noninvasive imaging by optical coherence tomography to monitor retinal degeneration in the mouse. Invest Ophthalmol Vis Sci. noviembre de 2001;42(12):2981-9.

118.Srinivasan VJ, Ko TH, Wojtkowski M, Carvalho M, Clermont A, Bursell SE, et al. Noninvasive volumetric imaging and morphometry of the rodent retina with high-speed, ultrahigh-resolution optical coherence tomography. Invest Ophthalmol Vis Sci. diciembre de 2006;47(12):5522-8.

119.Kocaoglu OP, Uhlhorn SR, Hernandez E, Juarez RA, Will R, Parel JM, et al. Simultaneous fundus imaging and optical coherence tomography of the mouse retina. Invest Ophthalmol Vis Sci. marzo de 2007;48(3):1283-9.

120.Venkateswaran N, Galor A, Wang J, Karp CL. Optical coherence tomography for ocular surface and corneal diseases: a review. Eye Vis. 12 de junio de 2018;5(1):13.

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

121.Pichi F, Curi ALL, Vasconcelos-Santos DV, Marchese A, Cicinelli MV, Miserocchi E, et al. Optical Coherence Tomography Findings in Infectious Posterior Uveitis. Ocul Immunol Inflamm. 3 de abril de 2022;30(3):652-63.

122.Adhi M, Duker JS. Optical coherence tomography--current and future applications. Curr Opin Ophthalmol. mayo de 2013;24(3):213-21.

123.Geevarghese A, Wollstein G, Ishikawa H, Schuman JS. Optical Coherence Tomography and Glaucoma. Annu Rev Vis Sci. 15 de septiembre de 2021;7:693-726.

124.Leung CKS. Optical Coherence Tomography Imaging for Glaucoma - Today and Tomorrow. Asia-Pac J Ophthalmol Phila Pa. 2016;5(1):11-6.

125.Hanson RLW, Airody A, Sivaprasad S, Gale RP. Optical coherence tomography imaging biomarkers associated with neovascular age-related macular degeneration: a systematic review. Eye Lond Engl. agosto de 2023;37(12):2438-53.

126.Vidal-Oliver L, Montolío-Marzo E, Gallego-Pinazo R, Dolz-Marco R. Optical coherence tomography biomarkers in early and intermediate age-related macular degeneration: A clinical guide. Clin Experiment Ophthalmol. marzo de 2024;52(2):207-19.

127.Di Pippo M, Santia C, Rullo D, Ciancimino C, Grassi F, Abdolrahimzadeh S. The Choroidal Vascularity Index Versus Optical Coherence Tomography Angiography in the Evaluation of the Choroid with a Focus on Age-Related Macular Degeneration. Tomogr Ann Arbor Mich. 4 de agosto de 2023;9(4):1456-70.

128.Khan A, Pin K, Aziz A, Han JW, Nam Y. Optical Coherence Tomography Image Classification Using Hybrid Deep Learning and Ant Colony Optimization. Sensors. 26 de julio de 2023;23(15):6706.

129.Wang R, Lovenberg C, Hess O, Todorich B. ROLE OF OPTICAL COHERENCE TOMOGRAPHY IN MANAGEMENT OF ACUTE POSTERIOR VITREOUS DETACHMENT AND ITS COMPLICATIONS. Retina Phila Pa. 1 de marzo de 2023;43(3):371-8.

130.Wang J, Baker A, Subramanian ML, Siegel NH, Chen X, Ness S, et al. Simultaneous visible light optical coherence tomography and near infrared OCT angiography in retinal pathologies: A case study. Exp Biol Med Maywood NJ. marzo de

2022;247(5):377-84.

131.Onal S, Tugal-Tutkun I, Neri P, P Herbort C. Optical coherence tomography imaging in uveitis. Int Ophthalmol. abril de 2014;34(2):401-35.

132.Kao BWH, Yonamine S, Zhao M, Oatts J, Yu Y, Ying GS, et al. Relationship Between Optical Coherence Tomography and Anterior Chamber Depth After Pupillary Dilation in Primary Angle Closure Suspects. J Glaucoma. 1 de noviembre de 2022;31(11):915-9.

133.González-Godínez S, Saucedo-Urdapilleta R, Mayorquín-Ruiz M, Velasco-Barona C, Moragrega-Adame E, Domínguez-Varela IA, et al. Ocular biometry in dense cataracts: Comparison of partial-coherence interferometry, swept-source optical coherence tomography and immersion ultrasound. Indian J Ophthalmol. enero de 2022;70(1):107-11.

134.Pakuliene G, Zimarinas K, Nedzelskiene I, Siesky B, Kuzmiene L, Harris A, et al. Anterior segment optical coherence tomography imaging and ocular biometry in cataract patients with open angle glaucoma comorbidity. BMC Ophthalmol. 8 de marzo de 2021;21(1):127.

135.Sella R, Zangwill LM, Weinreb RN, Afshari NA. Repeatability and Reproducibility of Corneal Epithelial Thickness Mapping With Spectral-Domain Optical Coherence Tomography in Normal and Diseased Cornea Eyes. Am J Ophthalmol. enero de 2019;197:88-97.

136.Pujari A, Agarwal D, Sharma N. Clinical role of swept source optical coherence tomography in anterior segment diseases: a review. Semin Ophthalmol. 17 de noviembre de 2021;36(8):684-91.

137.Siebelmann S, Scholz P, Sonnenschein S, Bachmann B, Matthaei M, Cursiefen C, et al. Anterior segment optical coherence tomography for the diagnosis of corneal dystrophies according to the IC3D classification. Surv Ophthalmol. 2018;63(3):365-80.

138.Nanji AA, Sayyad FE, Galor A, Dubovy S, Karp CL. High-Resolution Optical Coherence Tomography as an Adjunctive Tool in the Diagnosis of Corneal and Conjunctival Pathology. Ocul Surf. julio de 2015;13(3):226-35.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

139.Cunha LP, Pires LA, Cruzeiro MM, Almeida ALM, Martins LC, Martins PN, et al. Optical coherence tomography in neurodegenerative disorders. Arq Neuropsiquiatr. febrero de 2022;80(2):180-91.

140.Wagner SK, Romero-Bascones D, Cortina-Borja M, Williamson DJ, Struyven RR, Zhou Y, et al. Retinal Optical Coherence Tomography Features Associated With Incident and Prevalent Parkinson Disease. Neurology. 17 de octubre de 2023;101(16):e1581-93.

141.Song A, Johnson N, Ayala A, Thompson AC. Optical Coherence Tomography in Patients with Alzheimer's Disease: What Can It Tell Us? Eye Brain. 8 de enero de 2021;13:1-20.

142.Doustar J, Torbati T, Black KL, Koronyo Y, Koronyo-Hamaoui M. Optical Coherence Tomography in Alzheimer's Disease and Other Neurodegenerative Diseases. Front Neurol. 19 de diciembre de 2017;8:701.

143.Mirmosayyeb O, Yazdan Panah M, Mokary Y, Ghaffary EM, Ghoshouni H, Zivadinov R, et al. Optical coherence tomography (OCT) measurements and disability in multiple sclerosis (MS): A systematic review and meta-analysis. J Neurol Sci. 15 de noviembre de 2023;454:120847.

144.Mehmood A, Ali W, Song S, Din ZU, Guo RY, Shah W, et al. Optical coherence tomography monitoring and diagnosing retinal changes in multiple sclerosis. Brain Behav. octubre de 2021;11(10):e2302.

145.Ang M, Baskaran M, Werkmeister RM, Chua J, Schmidl D, Aranha Dos Santos V, et al. Anterior segment optical coherence tomography. Prog Retin Eye Res. septiembre de 2018;66:132-56.

146.Rong J, Haider A, Jeppesen TE, Josephson L, Liang SH. Radiochemistry for positron emission tomography. Nat Commun. 5 de junio de 2023;14:3257.

147.Crișan G, Moldovean-Cioroianu NS, Timaru DG, Andrieș G, Căinap C, Chiș V. Radiopharmaceuticals for PET and SPECT Imaging: A Literature Review over the Last Decade. Int J Mol Sci. 30 de abril de 2022;23(9):5023.

148.Vaquero JJ, Kinahan P. Positron Emission Tomography: Current Challenges and Opportunities for Technological Advances in Clinical and Preclinical Imaging

Systems. Annu Rev Biomed Eng. 2015;17:385-414.

149.Kubota K. From tumor biology to clinical Pet: a review of positron emission tomography (PET) in oncology. Ann Nucl Med. diciembre de 2001;15(6):471-86.

150.Salih S, Alkatheeri A, Alomaim W, Elliyanti A. Radiopharmaceutical Treatments for Cancer Therapy, Radionuclides Characteristics, Applications, and Challenges. Molecules. 16 de agosto de 2022;27(16):5231.

151.Consejo Seguridad Nuclear. La protección radiológica en el medio sanitario. En: La protección radiológica en el medio sanitario. Consejo de Seguridad Nacional; 2012.

152.Morín Zorrilla J, Cruz Arencibia J. Radiofármacos de galio 68. Nucleus. junio de 2012;(51):1-5.

153.Glaudemans AWJM, de Vries EFJ, Galli F, Dierckx RAJO, Slart RHJA, Signore A. The use of (18)F-FDG-PET/CT for diagnosis and treatment monitoring of inflammatory and infectious diseases. Clin Dev Immunol. 2013;2013:623036.

154.Hugues B, Emsen B, Pina Vegas L, Lepeule R, Ternacle J, Huguet R, et al. PET/CT for osteoarticular septic grafts in endocarditis: A large monocentric cohort. Joint Bone Spine. septiembre de 2023;90(5):105577.

155.Berthold LD, Steiner D, Scholz D, Alzen G, Zimmer KP. Imaging of chronic inflammatory bowel disease with 18F-FDG PET in children and adolescents. Klin Padiatr. julio de 2013;225(4):212-7.

156.Violeta Filip P, Cuciureanu D, Sorina Diaconu L, Maria Vladareanu A, Silvia Pop C. MALT lymphoma: epidemiology, clinical diagnosis and treatment. J Med Life. 2018;11(3):187-93.

157.Valotassiou V, Malamitsi J, Papatriantafyllou J, Dardiotis E, Tsougos I, Psimadas D, et al. SPECT and PET imaging in Alzheimer's disease. Ann Nucl Med. noviembre de 2018;32(9):583-93.

158.Bidesi NSR, Vang Andersen I, Windhorst AD, Shalgunov V, Herth MM. The role of neuroimaging in Parkinson's disease. J Neurochem. noviembre de 2021;159(4):660-89.

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

159.Lotan E, Friedman KP, Davidson T, Shepherd TM. Brain 18F-FDG-PET: Utility in the Diagnosis of Dementia and Epilepsy. Isr Med Assoc J IMAJ. marzo de 2020;22(3):178-84.

160.Jiang P, Liao SS, Lan XL, Jiang FG. Whole Body Positron Emission Tomography/Computed Tomography (PET/CT) in the Evaluation of Ophthalmic Tumors. Curr Med Sci. abril de 2018;38(2):310-7.

161.Kalemaki MS, Karantanas AH, Exarchos D, Detorakis ET, Zoras O, Marias K, et al. PET/CT and PET/MRI in ophthalmic oncology (Review). Int J Oncol. 3 de enero de 2020;56(2):417-29.

162.Ling ML, Yosar J, Lee BW, Shah SA, Jiang IW, Finniss A, et al. The diagnosis and management of temporal arteritis. Clin Exp Optom. septiembre de 2020;103(5):572-82.

163.Arora S, Damle NA, Meel R, Lata K, Tandon N, Sharma S, et al. Graves' Ophthalmopathy on 68Ga-DOTANOC Positron Emission Tomography/Computed Tomography. Indian J Nucl Med IJNM Off J Soc Nucl Med India. 2019;34(4):338-40.

164.El Jammal T, Loria O, Jamilloux Y, Gerfaud-Valentin M, Kodjikian L, Sève P. Uveitis as an Open Window to Systemic Inflammatory Diseases. J Clin Med. 14 de enero de 2021;10(2):281.

165.Bartlett B, Ludewick HP, Lee S, Verma S, Francis RJ, Dwivedi G. Imaging Inflammation in Patients and Animals: Focus on PET Imaging the Vulnerable Plaque. Cells. 28 de septiembre de 2021;10(10):2573.

166.García-Otero X, Mondelo-García C, Bandín-Vilar E, Gómez-Lado N, Silva-Rodríguez J, Rey-Bretal D, et al. PET study of intravitreal adalimumab pharmacokinetics in a uveitis rat model. Int J Pharm. 5 de noviembre de 2022;627:122261.

167.Nguyen NV, Karkhur S, Yuksel M, Hassan M, Halim MS, Nguyen QD, et al. Posterior Uveitis Associated with Large Vessel Giant Cell Arteritis. Ocul Immunol Inflamm. 2022;30(7-8):2019-22.

168.Bazewicz M, Makhoul D, Goffin L, El Mouden J, Judice M Relvas L, Caspers L, et al. Clinical Utility of 18F-FDG PET/CT in the Work-up of Children with Uveitis.

Ocul Immunol Inflamm. enero de 2023;31(1):77-86.

169.Bazewicz M, Heissigerova J, Pavesio C, Willermain F, Skrzypecki J. Ocular sarcoidosis in adults and children: update on clinical manifestation and diagnosis. J Ophthalmic Inflamm Infect. 18 de septiembre de 2023;13(1):41.

170.Castro-Balado A, Bandín-Vilar E, Cuartero-Martínez A, García-Quintanilla L, Hermelo-Vidal G, García-Otero X, et al. Cysteamine Eye Drops in Hyaluronic Acid Packaged in Innovative Single-Dose Systems: Stability and Ocular Biopermanence. Pharmaceutics. 15 de octubre de 2022;14(10):2194.

171.Díaz-Tomé V, Bendicho-Lavilla C, García-Otero X, Varela-Fernández R, Martín-Pastor M, Llovo-Taboada J, et al. Antifungal Combination Eye Drops for Fungal Keratitis Treatment. Pharmaceutics. 22 de diciembre de 2022;15(1):35.

172.Fernández-Ferreiro A, Silva-Rodríguez J, Otero-Espinar FJ, González-Barcia M, Lamas MJ, Ruibal A, et al. Positron Emission Tomography for the Development and Characterization of Corneal Permanence of Ophthalmic Pharmaceutical Formulations. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1 de febrero de 2017;58(2):772-80.

173.Carmon KS, Azhdarinia A. Application of Immuno-PET in Antibody-Drug Conjugate Development. Mol Imaging. 2018;17:1536012118801223.

174.Jacobson O, Li Q, Chen H, Niu G, Kiesewetter DO, Xu L, et al. PET-Guided Evaluation and Optimization of Internalized Antibody-Drug Conjugates Targeting Erythropoietin-Producing Hepatoma A2 Receptor. J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med. noviembre de 2017;58(11):1838-44.

175.Fernández-Ferreiro A, Luaces-Rodríguez A, Aguiar P, Pardo-Montero J, González-Barcia M, García-Varela L, et al. Preclinical PET Study of Intravitreal Injections. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1 de junio de 2017;58(7):2843-51.

176.Christoforidis JB, Briley K, Binzel K, Bhatia P, Wei L, Kumar K, et al. Systemic Biodistribution and Intravitreal Pharmacokinetic Properties of Bevacizumab, Ranibizumab, and Aflibercept in a Nonhuman Primate Model. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1 de noviembre de 2017;58(13):5636-45.

177.Chen P, Ding N, Pan D, Chen X, Li S, Luo Y, et al. PET imaging for the early evaluation of ocular inflammation in diabetic rats by using [18F]-DPA-714. Exp Eye

Res. agosto de 2024;245:109986.

178.Chen Y, Zhou Y, Zhu X, Yan G, Pan D, Wang L, et al. PET imaging of retinal inflammation in mice exposed to blue light using [18F]-DPA-714. Mol Vis. 2023;29:117-24.

179.Hood LE, Omenn GS, Moritz RL, Aebersold R, Yamamoto KR, Amos M, et al. New and improved proteomics technologies for understanding complex biological systems: Addressing a grand challenge in the life sciences. Proteomics. septiembre de 2012;12(18):2773-83.

180.Cui M, Cheng C, Zhang L. High-throughput proteomics: a methodological mini-review. Lab Investig J Tech Methods Pathol. 2022;102(11):1170-81.

181.Semba RD, Enghild JE. Proteomics and the Eye. Proteomics Clin Appl. abril de 2014;8(0):127-9.

182.Cox J, Mann M. Is proteomics the new genomics? Cell. 10 de agosto de 2007;130(3):395-8.

183.Aslam B, Basit M, Nisar MA, Khurshid M, Rasool MH. Proteomics: Technologies and Their Applications. J Chromatogr Sci. 1 de febrero de 2017;55(2):182-96.

184.Omenn GS, Lane L, Overall CM, Pineau C, Packer NH, Cristea IM, et al. The 2022 Report on the Human Proteome from the HUPO Human Proteome Project. J Proteome Res. 7 de abril de 2023;22(4):1024-42.

185.Lin D, Wu S, Cheng Y, Yan X, Liu Q, Ren T, et al. Early Proteomic Characteristics and Changes in the Optic Nerve Head, Optic Nerve, and Retina in a Rat Model of Ocular Hypertension. Mol Cell Proteomics MCP. noviembre de 2023;22(11):100654.

186.Macklin A, Khan S, Kislinger T. Recent advances in mass spectrometry based clinical proteomics: applications to cancer research. Clin Proteomics. 24 de mayo de 2020;17:17.

187.Rotello RJ, Veenstra TD. Mass Spectrometry Techniques: Principles and Practices for Quantitative Proteomics. Curr Protein Pept Sci. 2021;22(2):121-33.

188.Zhou L, Wei R, Zhao P, Koh SK, Beuerman RW, Ding C. Proteomic Analysis Revealed the Altered Tear Protein Profile in a Rabbit Model of Sjögren's Syndrome-

Associated Dry Eye. Proteomics. agosto de 2013;13(16):2469-81.

189.Zhou L, Beuerman RW, Chan CM, Zhao SZ, Li XR, Yang H, et al. Identification of tear fluid biomarkers in dry eye syndrome using iTRAQ quantitative proteomics. J Proteome Res. noviembre de 2009;8(11):4889-905.

190.Zheng Z, Sohn S, Ahn KJ, Bang D, Cho SB. Serum reactivity against herpes simplex virus type 1 UL48 protein in Behçet's disease patients and a Behçet's disease-like mouse model. Acta Derm Venereol. noviembre de 2015;95(8):952-8.

191.Liu YS, Pan JQ, Pan XB, Kong FS, Zhang JQ, Wei ZY, et al. Comparative Analysis of Molecular Landscape in Mouse Models and Patients Reveals Conserved Inflammation Pathways in Age-Related Macular Degeneration. Invest Ophthalmol Vis Sci. 4 de enero de 2024;65(1):13.

192.Chitranshi N, Dheer Y, Mirzaei M, Wu Y, Salekdeh GH, Abbasi M, et al. Loss of Shp2 Rescues BDNF/TrkB Signaling and Contributes to Improved Retinal Ganglion Cell Neuroprotection. Mol Ther J Am Soc Gene Ther. 6 de febrero de 2019;27(2):424-41.

193.Saraswathy S, Rao NA. Mitochondrial proteomics in experimental autoimmune uveitis oxidative stress. Invest Ophthalmol Vis Sci. diciembre de 2009;50(12):5559-66.

194.Okunuki Y, Usui Y, Kezuka T, Hattori T, Masuko K, Nakamura H, et al. Proteomic surveillance of retinal autoantigens in endogenous uveitis: implication of esterase D and brain-type creatine kinase as novel autoantigens. Mol Vis. 12 de junio de 2008;14:1094-104.

195.Bahk SC, Lee SH, Jang JU, Choi CU, Lee BS, Chae SC, et al. Identification of crystallin family proteins in vitreous body in rat endotoxin-induced uveitis: Involvement of crystallin truncation in uveitis pathogenesis. Proteomics. junio de 2006;6(11):3436-44.

196.Pepple KL, Rotkis L, Wilson L, Sandt A, Van Gelder RN. Comparative Proteomic Analysis of Two Uveitis Models in Lewis Rats. Invest Ophthalmol Vis Sci. diciembre de 2015;56(13):8449-56.

197.Mateos J, Fernández Pernas P, Fafián Labora J, Blanco F, Arufe M del C. Proteomic

Applications in the Study of Human Mesenchymal Stem Cells. Proteomes. 7 de febrero de 2014;2(1):53-71.

198.Sivanich MK, Gu TJ, Tabang DN, Li L. Recent advances in isobaric labeling and applications in quantitative proteomics. Proteomics. octubre de 2022;22(19-20):e2100256.

199.Tsirouki T, Dastiridou A, Symeonidis C, Tounakaki O, Brazitikou I, Kalogeropoulos C, et al. A Focus on the Epidemiology of Uveitis. Ocul Immunol Inflamm. 2 de enero de 2018;26(1):2-16.

200.Beltrán Catalán E, Brito García N, Pato Cour E, Muñoz Fernández S, Gómez Gómez A, Díaz Valle D, et al. Recomendaciones SER sobre el tratamiento de la uveítis. Reumatol Clínica. 1 de noviembre de 2023;19(9):465-77.

201.Niu H, Álvarez-Álvarez I, Guillén-Grima F, Aguinaga-Ontoso I. Prevalencia e incidencia de la enfermedad de Alzheimer en Europa: metaanálisis. Neurología. 1 de octubre de 2017;32(8):523-32.

202.Chen L, Deng H, Cui H, Fang J, Zuo Z, Deng J, et al. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. Oncotarget. 14 de diciembre de 2017;9(6):7204-18.

203.Chang MH, Shantha JG, Fondriest JJ, Lo MS, Angeles-Han ST. Uveitis in Children and Adolescents. Rheum Dis Clin North Am. noviembre de 2021;47(4):619-41.

204.Standardization of Uveitis Nomenclature for Reporting Clinical Data. Results of the First International Workshop. Am J Ophthalmol. septiembre de 2005;140(3):509-16.

205.Wang L, Guo Z, Zheng Y, Li Q, Yuan X, Hua X. Analysis of the clinical diagnosis and treatment of uveitis. Ann Palliat Med. diciembre de 2021;10(12):12782-8.

206.Agarwal A, Invernizzi A. The Role of Optical Coherence Tomography and Optical Coherence Tomography Angiography in the Differential Diagnosis of Posterior Uveitis. Ocul Immunol Inflamm. 3 de abril de 2022;30(3):682-9.

207.Pepple KL, Choi WJ, Wilson L, Van Gelder RN, Wang RK. Quantitative Assessment of Anterior Segment Inflammation in a Rat Model of Uveitis Using

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Spectral-Domain Optical Coherence Tomography. Invest Ophthalmol Vis Sci. julio de 2016;57(8):3567-75.

208.Gadjanski I, Williams SK, Hein K, Sättler MB, Bähr M, Diem R. Correlation of optical coherence tomography with clinical and histopathological findings in experimental autoimmune uveoretinitis. Exp Eye Res. julio de 2011;93(1):82-90.

209.Choi WJ, Pepple KL, Wang RK. Automated 3-D cell counting method for grading uveitis of rodent eye in vivo with optical coherence tomography. J Biophotonics. septiembre de 2018;11(9):e201800140.

210.Fan NW, Li J, Mittal SK, Foulsham W, Elbasiony E, Huckfeldt RM, et al. Characterization of Clinical and Immune Responses in an Experimental Chronic Autoimmune Uveitis Model. Am J Pathol. marzo de 2021;191(3):425-37.

211.Bansal R, Gupta A. Protein Biomarkers in Uveitis. Front Immunol. 3 de diciembre de 2020;11:610428.

212.Girol AP, Mimura KKO, Drewes CC, Bolonheis SM, Solito E, Farsky SHP, et al. Anti-inflammatory mechanisms of the annexin A1 protein and its mimetic peptide Ac2-26 in models of ocular inflammation in vivo and in vitro. J Immunol Baltim Md 1950. 1 de junio de 2013;190(11):5689-701.

213.Imai H, Ohta K, Yoshida A, Suzuki S, Hashizume K, Usami S, et al. {mu}-Crystallin, new candidate protein in endotoxin-induced uveitis. Invest Ophthalmol Vis Sci. julio de 2010;51(7):3554-9.

214.Rao NA, Saraswathy S, Wu GS, Katselis GS, Wawrousek EF, Bhat S. Elevated retina-specific expression of the small heat shock protein, alphaA-crystallin, is associated with photoreceptor protection in experimental uveitis. Invest Ophthalmol Vis Sci. marzo de 2008;49(3):1161-71.

215.Wang L, Zhang L, Wang ZF, Huang ZX, Hu X, Gong L, et al. The Role of αA-Crystallin in Experimental Autoimmune Uveitis. Curr Mol Med. 2015;15(6):558-64.

216.Zhang J, Wu J, Lu D, To CH, Lam TC, Lin B. Retinal Proteomic Analysis in a Mouse Model of Endotoxin-Induced Uveitis Using Data-Independent Acquisition-Based Mass Spectrometry. Int J Mol Sci. 9 de junio de 2022;23(12):6464.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

217.van Laar JAM, Rothova A, Missotten T, Kuijpers RWAM, van Hagen PM, van Velthoven MEJ. Diagnosis and treatment of uveitis; not restricted to the ophthalmologist. J Clin Transl Res. 30 de septiembre de 2015;1(2):94-9.

218.Di Paolo M, Corsi F, Cerri C, Bisti S, Piano I, Gargini C. A Window to the Brain: The Retina to Monitor the Progression and Efficacy of Saffron Repron® Pre-Treatment in an LPS Model of Neuroinflammation and Memory Impairment. Pharmaceuticals. 15 de septiembre de 2023;16(9):1307.

219.Md Pisar M, Chee BJ, Long I, Osman A. Protective effects of Centella asiatica extract on spatial memory and learning deficits in animal model of systemic inflammation induced by lipopolysaccharide. Ann Med. 55(1):2224970.

220.Castro M, Valero MS, López-Tofiño Y, López-Gómez L, Girón R, Martín-Fontelles MI, et al. Radiographic and histopathological study of gastrointestinal dysmotility in lipopolysaccharide-induced sepsis in the rat. Neurogastroenterol Motil. 2023;35(10):e14639.

221.Rosenbaum JT, Woods A, Kezic J, Planck SR, Rosenzweig HL. Contrasting Ocular Effects of Local versus Systemic Endotoxin. Invest Ophthalmol Vis Sci. agosto de 2011;52(9):6472-7.

222.Khan AI, Heit B, Andonegui G, Colarusso P, Kubes P. Lipopolysaccharide: a p38 MAPK-dependent disrupter of neutrophil chemotaxis. Microcirc N Y N 1994. 2005;12(5):421-32.

223.Chloé Benoist, Wendy Weidner, Paola Barbarino, Robbie Appleton-Sas, Lewis Arthurton, Gloria Mantineo, et al. From Plan to Impact VII: Dementia at a crossroads. Alzheimer's Disease International (ADI); 2024.

224.Monteiro AR, Barbosa DJ, Remião F, Silva R. Alzheimer's disease: Insights and new prospects in disease pathophysiology, biomarkers and disease-modifying drugs. Biochem Pharmacol. 1 de mayo de 2023;211:115522.

225.Khan S, Barve KH, Kumar MS. Recent Advancements in Pathogenesis, Diagnostics and Treatment of Alzheimer's Disease. Curr Neuropharmacol. 2020;18(11):1106-25.

226.Hart NJ, Koronyo Y, Black KL, Koronyo-Hamaoui M. Ocular indicators of Alzheimer's: exploring disease in the retina. Acta Neuropathol (Berl).

2016;132(6):767-87.

227.Gaire BP, Koronyo Y, Fuchs DT, Shi H, Rentsendorj A, Danziger R, et al. Alzheimer's disease pathophysiology in the Retina. Prog Retin Eye Res. 1 de julio de 2024;101:101273.

228.Sánchez-Puebla L, de Hoz R, Salobrar-García E, Arias-Vázquez A, González-Jiménez M, Ramírez AI, et al. Age-Related Retinal Layer Thickness Changes Measured by OCT in APPNL-F/NL-F Mice: Implications for Alzheimer's Disease. Int J Mol Sci. 27 de julio de 2024;25(15):8221.

229.Gao R, Luo H, Yan S, Ba L, Peng S, Bu B, et al. Retina as a potential biomarker for the early stage of Alzheimer's disease spectrum. Ann Clin Transl Neurol. 9 de agosto de 2024;

230.Cipolla JA, Jiang H, Simms AGY, Baumel B, Rundek T, Wang J. Impaired Retinal Capillary Function in Patients With Alzheimer Disease. J Neuro-Ophthalmol Off J North Am Neuro-Ophthalmol Soc. 1 de marzo de 2024;44(1):30-4.

231.Bermudez C, Lesnick TG, More SS, Ramanan VK, Knopman DS, Rabinstein AA, et al. Optical Coherence Tomography Angiography Retinal Imaging Associations With Burden of Small Vessel Disease and Amyloid Positivity in the Brain. J Neuro-Ophthalmol Off J North Am Neuro-Ophthalmol Soc. 1 de agosto de 2024;

232.Christinaki E, Kulenovic H, Hadoux X, Baldassini N, Van Eijgen J, De Groef L, et al. Retinal imaging biomarkers of neurodegenerative diseases. Clin Exp Optom. marzo de 2022;105(2):194-204.

233.Tams ALM, Sanz-Morello B, Westi EW, Mouhammad ZA, Andersen JV, Freude KK, et al. Decreased Glucose Metabolism and Glutamine Synthesis in the Retina of a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. Cell Mol Neurobiol. enero de 2022;42(1):291-303.

234.Chiasseu M, Alarcon-Martinez L, Belforte N, Quintero H, Dotigny F, Destroismaisons L, et al. Tau accumulation in the retina promotes early neuronal dysfunction and precedes brain pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. Mol Neurodegener. 3 de agosto de 2017;12(1):58.

235.Wang MD, Zhang S, Liu XY, Wang PP, Zhu YF, Zhu JR, et al. Salvianolic acid B

ameliorates retinal deficits in an early-stage Alzheimer's disease mouse model through downregulating BACE1 and Aβ generation. Acta Pharmacol Sin. noviembre de 2023;44(11):2151-68.

236.Dutta D, Jana M, Paidi RK, Majumder M, Raha S, Dasarathy S, et al. Tau fibrils induce glial inflammation and neuropathology via TLR2 in Alzheimer's disease–related mouse models. J Clin Invest. 133(18):e161987.

237.Latina V, Atlante A, Malerba F, La Regina F, Balzamino BO, Micera A, et al. The Cleavage-Specific Tau 12A12mAb Exerts an Anti-Amyloidogenic Action by Modulating the Endocytic and Bioenergetic Pathways in Alzheimer's Disease Mouse Model. Int J Mol Sci. 2 de junio de 2023;24(11):9683.

238.National Research Council (US). Guide for the Care and Use of Laboratory Animals [Internet]. 8th ed. Washington (DC): National Academies Press (US); 2011 [citado 22 de mayo de 2023]. (The National Academies Collection: Reports funded by National Institutes of Health). Disponible en: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK54050/

239.ARVO. The Association for Research in Vision and Ophthalmology- Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research [Internet]. 2021 [citado 22 de mayo de 2023]. Disponible en: https://www.arvo.org/About/policies/statement-for-the-use-of-animals-in-ophthalmic-and-vision-research/

240.García-Otero X, Mondelo-García C, González F, Perez-Fernandez R, Avila L, Antúnez-López JR, et al. Anti-Inflammatory Effect of Tacrolimus/Hydroxypropyl-β-Cyclodextrin Eye Drops in an Endotoxin-Induced Uveitis Model. Pharmaceutics. octubre de 2021;13(10):1737.

241.da Silva PS, Girol AP, Oliani SM. Mast cells modulate the inflammatory process in endotoxin-induced uveitis. Mol Vis. 2011;17:1310-9.

242.Luaces-Rodríguez A, del Amo EM, Mondelo-García C, Gómez-Lado N, Gonzalez F, Ruibal Á, et al. PET study of ocular and blood pharmacokinetics of intravitreal bevacizumab and aflibercept in rats. Eur J Pharm Biopharm. 1 de septiembre de 2020;154:330-7.

243.Arras M, Autenried P, Rettich A, Spaeni D, Rülicke T. Optimization of intraperitoneal injection anesthesia in mice: drugs, dosages, adverse effects, and

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

anesthesia depth. Comp Med. octubre de 2001;51(5):443-56.

244.Bermudez MA, Sendon-Lago J, Seoane S, Eiro N, Gonzalez F, Saa J, et al. Anti-inflammatory effect of conditioned medium from human uterine cervical stem cells in uveitis. Exp Eye Res. agosto de 2016;149:84-92.

245.López-López M, Regueiro U, Bravo SB, Chantada-Vázquez M del P, Varela-Fernández R, Ávila-Gómez P, et al. Tear Proteomics in Keratoconus: A Quantitative SWATH-MS Analysis. Invest Ophthalmol Vis Sci. 25 de agosto de 2021;62(10):30.

246.Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Jensen ON, Podtelejnikov AV, Neubauer G, et al. A strategy for identifying gel-separated proteins in sequence databases by MS alone. Biochem Soc Trans. agosto de 1996;24(3):893-6.

247.Loening AM, Gambhir SS. AMIDE: a free software tool for multimodality medical image analysis. Mol Imaging. julio de 2003;2(3):131-7.

248.Yoshiyama Y, Higuchi M, Zhang B, Huang SM, Iwata N, Saido TC, et al. Synapse loss and microglial activation precede tangles in a P301S tauopathy mouse model. Neuron. 1 de febrero de 2007;53(3):337-51.

249.Egwuagu CE, Alhakeem SA, Mbanefo EC. Uveitis: Molecular Pathogenesis and Emerging Therapies. Front Immunol. 30 de abril de 2021;12:623725.

250.Mölzer C, Heissigerova J, Wilson HM, Kuffova L, Forrester JV. Immune Privilege: The Microbiome and Uveitis. Front Immunol. 25 de enero de 2021;11:608377.

251.Garg V, Nirmal J, Riadi Y, Kesharwani P, Kohli K, Jain GK. Amelioration of Endotoxin-Induced Uveitis in Rabbit by Topical Administration of Tacrolimus Proglycosome Nano-Vesicles. J Pharm Sci. febrero de 2021;110(2):871-5.

252.Gupta SK, Agarwal R, Srivastava S, Agarwal P, Agrawal SS, Saxena R, et al. The Anti-inflammatory Effects of Curcuma longa and Berberis aristata in Endotoxin-Induced Uveitis in Rabbits. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1 de septiembre de 2008;49(9):4036-40.

253.Arıkan S, Guven S, Sehitoglu MH, Elmas S. The possible effect of topically applied azithromycin and moxifloxacin on the alleviation of uveitis. Int Ophthalmol. 1 de diciembre de 2023;43(12):4451-60.

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

254.Chu CJ, Gardner PJ, Copland DA, Liyanage SE, Gonzalez-Cordero A, kleine Holthaus SM, et al. Multimodal analysis of ocular inflammation using the endotoxin-induced uveitis mouse model. Dis Model Mech. 1 de abril de 2016;9(4):473-81.

255.Herbort CP, Okumura A, Mochizuki M. Immunopharmacological analysis of endotoxin-induced uveitis in the rat. Exp Eye Res. 1 de mayo de 1989;48(5):693-705.

256.Herbert HM, Viswanathan A, Jackson H, Lightman SL. Risk factors for elevated intraocular pressure in uveitis. J Glaucoma. abril de 2004;13(2):96-9.

257.Friedman DS, Holbrook JT, Ansari H, Alexander J, Burke A, Reed SB, et al. Risk of elevated intraocular pressure and glaucoma in patients with uveitis; results of the Multicenter Uveitis Steroid Treatment Trial. Ophthalmology. agosto de 2013;120(8):1571-9.

258.Kothari S, Foster CS, Pistilli M, Liesegang TL, Daniel E, Sen HN, et al. The Risk of Intraocular Pressure Elevation in Pediatric Non-infectious Uveitis. Ophthalmology. octubre de 2015;122(10):1987-2001.

259.Grzybowski A, Told R, Sacu S, Bandello F, Moisseiev E, Loewenstein A, et al. 2018 Update on Intravitreal Injections: Euretina Expert Consensus Recommendations. Ophthalmol J Int Ophtalmol Int J Ophthalmol Z Augenheilkd. 2018;239(4):181-93.

260.Lemos V, Cabugueira A, Noronha M, Abegão Pinto L, Reina M, Branco J, et al. Intraocular Pressure in Eyes Receiving Intravitreal Antivascular Endothelial Growth Factor Injections. Ophthalmol J Int Ophtalmol Int J Ophthalmol Z Augenheilkd. 2015;233(3-4):162-8.

261.Sole MJD, Sande PH, Felipe AE, Fernandez DC, Sarmiento MIK, Aba MA, et al. Characterization of uveitis induced by use of a single intravitreal injection of bacterial lipopolysaccharide in cats. Am J Vet Res. 1 de noviembre de 2008;69(11):1487-95.

262.Choi WJ, Pepple KL, Zhi Z, Wang RK. Optical coherence tomography based microangiography for quantitative monitoring of structural and vascular changes in a rat model of acute uveitis in vivo: a preliminary study. J Biomed Opt. enero de 2015;20(1):016015.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

263.Downie LE, Stainer MJ, Chinnery HR. Monitoring of strain-dependent responsiveness to TLR activation in the mouse anterior segment using SD-OCT. Invest Ophthalmol Vis Sci. 20 de noviembre de 2014;55(12):8189-99.

264.Chen J, Qian H, Horai R, Chan CC, Caspi RR. Use of optical coherence tomography and electroretinography to evaluate retinal pathology in a mouse model of autoimmune uveitis. PloS One. 2013;8(5):e63904.

265.Gutowski MB, Wilson L, Van Gelder RN, Pepple KL. In Vivo Bioluminescence Imaging for Longitudinal Monitoring of Inflammation in Animal Models of Uveitis. Invest Ophthalmol Vis Sci. marzo de 2017;58(3):1521-8.

266.Chen J, Caspi RR. Clinical and Functional Evaluation of Ocular Inflammatory Disease Using the Model of Experimental Autoimmune Uveitis. Methods Mol Biol Clifton NJ. 2019;1899:211-27.

267.Lippai R, Veres-Székely A, Sziksz E, Iwakura Y, Pap D, Rokonay R, et al. Immunomodulatory role of Parkinson's disease 7 in inflammatory bowel disease. Sci Rep. 16 de julio de 2021;11:14582.

268.Fujii H, Tanaka H, Nomoto Y, Harata N, Oota S, Isogai J, et al. Usefulness of 18F-FDG PET/CT for evaluating response of ocular adnexal lymphoma to treatment. Medicine (Baltimore). abril de 2018;97(17):e0543.

269.Wang X, Lou N, Eberhardt A, Yang Y, Kusk P, Xu Q, et al. An ocular glymphatic clearance system removes β-amyloid from the rodent eye. Sci Transl Med. 25 de marzo de 2020;12(536):eaaw3210.

270.Kokona D, Ebneter A, Escher P, Zinkernagel MS. Colony-stimulating factor 1 receptor inhibition prevents disruption of the blood-retina barrier during chronic inflammation. J Neuroinflammation. 12 de diciembre de 2018;15:340.

271.Lai W, Huang J, Fang W, Deng S, Xie Y, Wang W, et al. Optic nerve head: A gatekeeper for vitreous infectious insults? Front Immunol. 20 de septiembre de 2022;13:987771.

272.Xu BY, Mai DD, Penteado RC, Saunders L, Weinreb RN. Reproducibility and Agreement of Anterior Segment Parameter Measurements Obtained Using the CASIA2 and Spectralis OCT2 Optical Coherence Tomography Devices. J Glaucoma.

noviembre de 2017;26(11):974-9.

273.Bell BA, Bonilha VL, Hagstrom SA, Anand-Apte B, Hollyfield JG, Samuels IS. Prolonged ocular exposure leads to retinal lesions in mice. Exp Eye Res. agosto de 2019;185:107672.

274.Lee YT, Pai MC. Recognition of personally familiar scenes in patients with very mild Alzheimer's disease: effects of spatial frequency and luminance. J Alzheimers Dis JAD. 2012;29(2):441-8.

275.Risacher SL, WuDunn D, Pepin SM, MaGee TR, McDonald BC, Flashman LA, et al. Visual contrast sensitivity in AD, MCI, & older adults with cognitive complaints. Neurobiol Aging. abril de 2013;34(4):1133.

276.Owsley C, McGwin G, Swain TA, Clark ME, Thomas TN, Goerdt L, et al. Outer Retinal Thickness Is Associated With Cognitive Function in Normal Aging to Intermediate Age-Related Macular Degeneration. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1 de mayo de 2024;65(5):16.

277.Xu Y, Aung HL, Hesam-Shariati N, Keay L, Sun X, Phu J, et al. Contrast Sensitivity, Visual Field, Color Vision, Motion Perception, and Cognitive Impairment: A Systematic Review. J Am Med Dir Assoc. agosto de 2024;25(8):105098.

278.Javaid FZ, Brenton J, Guo L, Cordeiro MF. Visual and Ocular Manifestations of Alzheimer's Disease and Their Use as Biomarkers for Diagnosis and Progression. Front Neurol. 2016;7:55.

279.Hinton DR, Sadun AA, Blanks JC, Miller CA. Optic-nerve degeneration in Alzheimer's disease. N Engl J Med. 21 de agosto de 1986;315(8):485-7.

280.Liu B, Rasool S, Yang Z, Glabe CG, Schreiber SS, Ge J, et al. Amyloid-Peptide Vaccinations Reduce β-Amyloid Plaques but Exacerbate Vascular Deposition and Inflammation in the Retina of Alzheimer's Transgenic Mice. Am J Pathol. noviembre de 2009;175(5):2099-110.

281.Gupta VB, Chitranshi N, den Haan J, Mirzaei M, You Y, Lim JK, et al. Retinal changes in Alzheimer's disease- integrated prospects of imaging, functional and molecular advances. Prog Retin Eye Res. mayo de 2021;82:100899.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

282.Cunha JP, Moura-Coelho N, Proença RP, Dias-Santos A, Ferreira J, Louro C, et al. Alzheimer's disease: A review of its visual system neuropathology. Optical coherence tomography-a potential role as a study tool in vivo. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol. noviembre de 2016;254(11):2079-92.

283.Batista A, Guimarães P, Martins J, Moreira PI, Ambrósio AF, Castelo-Branco M, et al. Normative mice retinal thickness: 16-month longitudinal characterization of wild-type mice and changes in a model of Alzheimer's disease. Front Aging Neurosci. 2023;15:1161847.

284.Ferreira H, Martins J, Moreira PI, Ambrósio AF, Castelo-Branco M, Serranho P, et al. Longitudinal normative OCT retinal thickness data for wild-type mice, and characterization of changes in the 3×Tg-AD mice model of Alzheimer's disease. Aging. 2 de abril de 2021;13(7):9433-54.

285.Koronyo-Hamaoui M, Koronyo Y, Ljubimov AV, Miller CA, Ko MK, Black KL, et al. Identification of Amyloid Plaques in Retinas from Alzheimer's Patients and Noninvasive In Vivo Optical Imaging of Retinal Plaques in a Mouse Model. NeuroImage. enero de 2011;54S1:S204-17.

286.Marquez A, Guernsey LS, Frizzi KE, Cundiff M, Constantino I, Muttalib N, et al. Tau associated peripheral and central neurodegeneration: Identification of an early imaging marker for tauopathy. Neurobiol Dis. abril de 2021;151:105273.

287.Mancino R, Martucci A, Cesareo M, Giannini C, Corasaniti MT, Bagetta G, et al. Glaucoma and Alzheimer Disease: One Age-Related Neurodegenerative Disease of the Brain. Curr Neuropharmacol. agosto de 2018;16(7):971-7.

288.Sen S, Saxena R, Tripathi M, Vibha D, Dhiman R. Neurodegeneration in Alzheimer's disease and glaucoma: overlaps and missing links. Eye. septiembre de 2020;34(9):1546-53.

289.Gupta VK, Chitranshi N, Gupta VB, Golzan M, Dheer Y, Wall RV, et al. Amyloid β accumulation and inner retinal degenerative changes in Alzheimer's disease transgenic mouse. Neurosci Lett. 3 de junio de 2016;623:52-6.

290.McKinnon SJ, Lehman DM, Kerrigan-Baumrind LA, Merges CA, Pease ME, Kerrigan DF, et al. Caspase activation and amyloid precursor protein cleavage in

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

rat ocular hypertension. Invest Ophthalmol Vis Sci. abril de 2002;43(4):1077-87.

291.Ito Y, Shimazawa M, Tsuruma K, Mayama C, Ishii K, Onoe H, et al. Induction of amyloid-β(1-42) in the retina and optic nerve head of chronic ocular hypertensive monkeys. Mol Vis. 2012;18:2647-57.

292.Deschênes MC, Descovich D, Moreau M, Granger L, Kuchel GA, Mikkola TS, et al. Postmenopausal hormone therapy increases retinal blood flow and protects the retinal nerve fiber layer. Invest Ophthalmol Vis Sci. mayo de 2010;51(5):2587-600.

293.Na KS, Jee DH, Han K, Park YG, Kim MS, Kim EC. The Ocular Benefits of Estrogen Replacement Therapy: A Population-Based Study in Postmenopausal Korean Women. PLoS ONE [Internet]. 2014 [citado 29 de agosto de 2024];9(9). Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4161336/

294.Youngblood H, Schoenlein PV, Pasquale LR, Stamer WD, Liu Y. Estrogen dysregulation, intraocular pressure, and glaucoma risk. Exp Eye Res. 1 de diciembre de 2023;237:109725.

295.Schön C, Hoffmann NA, Ochs SM, Burgold S, Filser S, Steinbach S, et al. Long-Term In Vivo Imaging of Fibrillar Tau in the Retina of P301S Transgenic Mice. PLoS ONE. 31 de diciembre de 2012;7(12):e53547.

296.den Haan J, Morrema THJ, Verbraak FD, de Boer JF, Scheltens P, Rozemuller AJ, et al. Amyloid-beta and phosphorylated tau in post-mortem Alzheimer's disease retinas. Acta Neuropathol Commun. 28 de diciembre de 2018;6:147.

297.Neuroinflammatory Processes, A1 Astrocyte Activation and Protein Aggregation in the Retina of Alzheimer's Disease Patients, Possible Biomarkers for Early Diagnosis - PMC [Internet]. [citado 13 de agosto de 2024]. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6737046/

298.Carelli V, La Morgia C, Ross-Cisneros FN, Sadun AA. Optic neuropathies: the tip of the neurodegeneration iceberg. Hum Mol Genet. 1 de octubre de 2017;26(R2):R139-50.

299.Retinal Ganglion Cells and Circadian Rhythms in Alzheimer's Disease, Parkinson's Disease, and Beyond - PMC [Internet]. [citado 13 de agosto de 2024]. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5415575/

300.Kesler A, Vakhapova V, Korczyn AD, Naftaliev E, Neudorfer M. Retinal thickness in patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. Clin Neurol Neurosurg. septiembre de 2011;113(7):523-6.

301.Cheung CY lui, Ong YT, Hilal S, Ikram MK, Low S, Ong YL, et al. Retinal ganglion cell analysis using high-definition optical coherence tomography in patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. J Alzheimers Dis JAD. 2015;45(1):45-56.

302.Visual field loss in senile dementia of the Alzheimer's type - PubMed [Internet]. [citado 23 de agosto de 2024]. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7824139/

303.Buscho S, Palacios E, Xia F, Shi S, Li S, Luisi J, et al. Longitudinal characterization of retinal vasculature alterations with optical coherence tomography angiography in a mouse model of tauopathy. Exp Eye Res. noviembre de 2022;224:109240.

304.Keeling E, Lotery AJ, Tumbarello DA, Ratnayaka JA. Impaired Cargo Clearance in the Retinal Pigment Epithelium (RPE) Underlies Irreversible Blinding Diseases. Cells [Internet]. febrero de 2018 [citado 23 de agosto de 2024];7(2). Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5850104/

305.Rajanala K, Dotiwala F, Upadhyay A. Geographic atrophy: pathophysiology and current therapeutic strategies. Front Ophthalmol. 2023;3:1327883.

306.Liu Y, Wei W, Baazaoui N, Liu F, Iqbal K. Inhibition of AMD-Like Pathology With a Neurotrophic Compound in Aged Rats and 3xTg-AD Mice. Front Aging Neurosci. 19 de noviembre de 2019;11:309.

307.Xu QA, Boerkoel P, Hirsch-Reinshagen V, Mackenzie IR, Hsiung GYR, Charm G, et al. Müller cell degeneration and microglial dysfunction in the Alzheimer's retina. Acta Neuropathol Commun. 2022;10(1).

308.Koronyo Y, Rentsendorj A, Mirzaei N, Regis GC, Sheyn J, Shi H, et al. Retinal pathological features and proteome signatures of Alzheimer's disease. Acta Neuropathol (Berl). 2023;145(4):409-38.

309.Salobrar-Garcia E, Leal M, Hoyas I, Salazar J j., Ramirez A i., de Hoz R, et al. Early changes in mild Alzheimer's disease in the neuroretinal rim segmentation. Acta

Ophthalmol (Copenh) [Internet]. 2016 [citado 21 de agosto de 2024];94(S256). Disponible en: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1755-3768.2016.0449

310. Cheung N, Mosley T, Islam A, Kawasaki R, Sharrett AR, Klein R, et al. Retinal microvascular abnormalities and subclinical magnetic resonance imaging brain infarct: a prospective study. Brain. julio de 2010;133(7):1987-93.

311. Regueira Budiño A, de Moura J, Cuartero-Martínez A, Custodia A, Gómez-Lado N, Ouro A, et al. Deep Learning-based retinal layer segmentation in PS19 tau transgenic mice using optical coherence tomography images. Poster Flash presentation presentado en: Young Spanish Molecular Imaging Network 4th Annual meeting; 2023 ene 19; Santiago de Compostela, España.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

APÉNDICE

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

APÉNDICE

CONFLICTO DE INTERESES

El doctorando declara que no existe ningún conflicto de intereses respecto de la Tesis Doctoral.

ESTUDIOS PRECLÍNICOS

En la presente Tesis Doctoral, se utilizaron un total de 38 animales: 29 ratas macho Sprague Dawley para el estudio de caracterización de los modelos de uveítis, con un peso medio de 262 ± 14 g y 6 semanas de edad, suministradas por el Centro de Biomedicina Experimental de Galicia de la Universidad de Santiago de Compostela (CEBEGA, Santiago de Compostela, España); y 9 ratonas hembras para el modelo de tauopatía suministradas por The Jackson Laboratory (Filadelfia, PA, EE.UU.). Todos los procedimientos se realizaron en el Servicio de Imagen Preclínica del Centro de Biomedicina Experimental (CEBEGA, número REGA: ES150780292901) y realizaron de acuerdo con la declaración ARVO para el uso de animales en investigaciones oftálmicas y de la visión, así como con la normativa europea y nacional (86/609/CEE, 2003/ 65/CE, 2010/63/UE, RD 1201/2005 y RD53/2013). Las inyecciones intravítreas y procedimientos de imagen fueron aprobados por el Comité Ético de Investigación del Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela (IDIS) (15012/2021/001 y 15011/2021/004).

Los animales se mantuvieron en todo el momento de los estudios con alimento específico para su especie y agua a voluntad, libres de patógenos específicos en condiciones de humedad y temperatura controladas y en ciclos regulados de 12 horas día-noche. Los procedimientos se realizaron bajo anestesia general inducida de isoflurano/oxígeno (v/v%) (2,5-3,0%) o bajo inyección intraperitoneal de ketamina/xilacina (75 mg/kg of ketamina, Ketolar 50 mg/mL, Pfizer, Madrid, ES; 10 mg/kg of xilacina, Nerfasin 20 mg/mL, Fatro Iberica, Barcelona, ES). Para evitar daños indeseables en las estructuras oculares y mantener la superficie ocular hidratada, previo a los procedimientos y adquisiciones oculares, se les administró una gota de colirio midriático (10 mg/mL ciclopentolato hidrocloruro; Colirofta® Ciclopléjico,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Alcon Healthcare, Texas, USA) y lagrima artificial (3 mg/mL hipromelosa y 5.5 mg/mL cloruro de sodio; ACUOLENS®, Alcon Healthcare, Texas, USA).

Durante la anestesia, los animales fueron monitorizados por un personal acreditado y capacitado en el manejo, cuidado y realización de procedimientos con animales de laboratorio (categorías B o C, funciones a, b y c).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

RESOLUCIÓN DE AUTORIZACIÓN DE PROYECTOS DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

XUNTA DE GALICIA
CONSELLERÍA DO MEDIO RURAL

Xefatura Territorial
Sº de Gandaría
Edificio administrativo Monelos, 4º andar
Rúa Vicente Ferrer, Nº 2
15008 A Coruña
Tfno.: 981 184 565
Correo electrónico: servizo.gandaria.a.coruna@xunta.gal

galicia

RESOLUCIÓN DE AUTORIZACIÓN DE PROXECTO DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

Expediente núm.: 15012/2021/001
Persoa solicitante: Anxo Vidal Figueroa
Forma de inicio: solicitude da persoa interesada

Data de inicio do expediente: 28.2.2021
Procedemento: resolución de autorización

ANTECEDENTES

A persoa solicitante presentou con data 28.2.2021 unha solicitude para a realización do proxecto de experimentación animal (entrada no Rexistro Electrónico da Xunta de Galicia 2021/430700), cuxos datos se detallan a continuación:

Denominación do proxecto: *Estudo da farmacocinética intravítrea de anticorpos marcados con circonio-89 mediante inxección intravítrea en ratas*

Nome do centro usuario: Centro de Biomedicina Experimental (CEBEGA) da Universidade de Santiago de Compostela
Persoa responsable do proxecto: Anxo Fernández Ferreiro
Establecemento onde se realizarán os procedementos do proxecto (ou lugar xeográfico no caso de traballos de campo): Centro de Biomedicina Experimental (CEBEGA)

Clasificación do proxecto : Tipo I ☐ Tipo II ☒ Tipo III ☐

CONSIDERACIÓNS LEGAIS E TÉCNICAS

1 O Real decreto 53/2013, de 1 de febreiro (BOE 34, do 8 de febreiro), polo que se establecen as normas básicas aplicables para a protección dos animais utilizados en experimentación e outros fins científicos, incluíndo a docencia, establece no seu artigo 33 as condicións de autorizacións dos proxectos con animais de experimentación.

2 O artigo 88 da Lei 39/2015, de 1 de outubro, do procedemento administrativo común das administracións públicas (BOE 236, do 2 de outubro de 2015) establece que a resolución que poña fin o procedemento decidirá todas as cuestións expostas polos interesados e aquelas outras derivadas deste.

CVE: FM21cXNFg7
Verificación: https://sede.xunta.gal/cve

Xacobeo 2021

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

XUNTA DE GALICIA
CONSELLERÍA DO MEDIO RURAL

Xefatura Territorial
Sº de Gandaría
Edificio administrativo Monelos, 4º andar
Rúa Vicente Ferrer, Nº 2
15008 A Coruña
Tfno.: 981 184 565
Correo electrónico: servizo.gandaria.a.coruna@xunta.gal

galicia

3 O Servizo de Gandaría da Coruña revisou a documentación achegada na solicitude e o resultado favorable da avaliación do proxecto realizada polo órgano habilitado, a Sección de Experimentación Animal do Comité de Bioética da Universidade de Santiago de Compostela.

Esta xefatura territorial é competente para ditar unha resolución, de conformidade co Decreto 149/2018, do 5 de decembro, polo que se establece a estrutura orgánica da Consellería do Medio Rural e se modifica parcialmente o Decreto 177/2016, do 15 de decembro, polo que se fixa a estrutura orgánica da Vicepresidencia e das consellerías da Xunta de Galicia (DOG 235, do 11 de novembro).

De acordo con todo o indicado, RESOLVO:

1 Autorizar o proxecto solicitado.

2 O proxecto non precisa someterse a unha avaliación retrospectiva.

3 A autorización deste proxecto terá unha duración de tres anos e unha vez transcorrido este tempo deberá ser renovada.

A citada autorización é unicamente válida nas condicións que figuran no expediente. Ante calquera cambio significativo no proxecto que poida ter efectos negativos sobre o benestar dos animais, deberá solicitar a confirmación da autorización ao Servizo Provincial de Gandaría.

Esta autorización poderá ser suspendida no caso de que o proxecto non se leve a cabo de acordo coas condicións de autorización e retirala, previo expediente tramitado ao que se lle dará audiencia.

Contra a presente resolución, que non pon fin á vía administrativa, poderá interpoñer un recurso de alzada ante o conselleiro de Medio Rural. O prazo comezará a contar dende o día seguinte ao da recepción desta resolución. Todo isto, segundo o disposto nos artigos 121 e 122 da citada Lei 39/2015.

Mediante este escrito notificaselle a Anxo Vidal Figueroa esta resolución segundo o esixido no artigo 40.1 da antedita Lei 39/2015.

Asinado por: LOPEZ LOPEZ, MONICA
Cargo: Xefa Territorial
Data e hora: 12/03/2021 14:57:52

CVE: FMC1kfNFg7
Verificación: https://sede.xunta.gal/cve

Xacobeo 2021

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

XUNTA DE GALICIA | CONSELLERÍA DO MEDIO RURAL

Xacobeo 21·22

RESOLUCIÓN DE AUTORIZACIÓN DE PROXECTO DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

Expediente núm.: 15011/2021/004 **Data de inicio do expediente:** 30.7.2021
Persoa solicitante: Isabel Lista García **Procedemento:** resolución de autorización
Forma de inicio: solicitude da persoa interesada

ANTECEDENTES

A persoa solicitante, como representante da Fundación Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela (IDIS), presentou con data 30.7.2021 unha solicitude para a realización do proxecto de experimentación animal (entrada no Rexistro electrónico da Xunta de Galicia 2021/1855490). Posteriormente, achegou nova documentación o 23.9.2021 (entrada no Rexistro electrónico da Xunta de Galicia 2021/2237505), cuxos datos son os seguintes:

Denominación do proxecto: Estudo traslacional da disfunción endotelial como factor clave da etiopatoxénese da enfermidade de Alzheimer: do laboratorio á clínica
Nome do centro usuario: Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela
Persoa responsable do proxecto: Tomás Sobrino Moreiras
Establecemento onde se realizarán os procedementos do proxecto (ou lugar xeográfico no caso de traballos de campo): Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela

Clasificación do proxecto: Tipo I ☐ Tipo II [X] Tipo III ☐

CONSIDERACIÓNS LEGAIS E TÉCNICAS

1 O Real decreto 53/2013, de 1 de febreiro (BOE 34, do 8 de febreiro), polo que se establecen as normas básicas aplicables para a protección dos animais utilizados en experimentación e outros fins científicos, incluíndo a docencia, establece no seu artigo 33 as condicións de autorizacións dos proxectos con animais de experimentación.

2 O artigo 88 da Lei 39/2015, do 1 de outubro, do procedemento administrativo común das administracións públicas (BOE 236, do 2 de outubro de 2015) establece

CONSELLERÍA DO MEDIO RURAL
XEFATURA TERRITORIAL
SERVIZO DE GANDARÍA
Edificio Administrativo Monelos
R/ Vicente Ferrer, 2, 4º andar
15071 A Coruña
T: 981 184 565
servizo.gandaria.a.coruna@xunta.gal
mediorural.xunta.gal

CSV: XT APS 0KU 3
Verificación: https://sede.xunta.gal/csv

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

que a resolución que poña fin o procedemento decidirá todas as cuestións expostas polos interesados e aquelas outras derivadas deste.

3 O Servizo de Gandaría da Coruña revisou a documentación achegada na solicitude e o resultado favorable da avaliación do proxecto realizada polo órgano habilitado, o Comité de Ética de Investigación Animal do IDIS.

Esta xefatura territorial é competente para ditar unha resolución, de conformidade co Decreto 149/2018, do 5 de decembro, polo que se establece a estrutura orgánica da Consellería do Medio Rural e se modifica parcialmente o Decreto 177/2016, do 15 de decembro, polo que se fixa a estrutura orgánica da Vicepresidencia e das consellerías da Xunta de Galicia (DOG 235, do 11 de novembro).

De acordo con todo o indicado, RESOLVO:

1 Autorizar o proxecto solicitado.

2 O proxecto non precisa someterse a unha avaliación retrospectiva.

3 A autorización deste proxecto terá unha duración de tres anos e tres meses e unha vez transcorrido este tempo, esta autorización deberá ser renovada.

A citada autorización é unicamente válida nas condicións que figuran no expediente. Ante calquera cambio significativo no proxecto que poida ter efectos negativos sobre o benestar dos animais, deberá solicitar a confirmación da autorización ao Servizo Provincial de Gandaría.

Esta autorización poderá ser suspendida no caso de que o proxecto non se leve a cabo de acordo coas condicións de autorización e retirala, previo expediente tramitado ao que se lle dará audiencia.

Contra a presente resolución, que non pon fin á vía administrativa, poderá interpoñer un recurso de alzada ante o conselleiro de Medio Rural. O prazo comezará a contar dende o día seguinte ao da recepción desta resolución. Todo isto, segundo o disposto nos artigos 121 e 122 da citada Lei 39/2015.

Mediante este escrito notifícaselle a Isabel Lista García esta resolución segundo o esixido no artigo 40.1 da antedita Lei 39/2015.

A Coruña, 29 de setembro de 2021
O xefe territorial
Jose Manuel Santos Maneiro
(asinado electronicamente)

Asinado por: SANTOS MANEIRO, JOSE MANUEL
Cargo: Xefe Territorial
Data e hora: 29/09/2021 15:04:09

CVE: X1AP0198AJ3
Validación: https://sede.xunta.gal/cve

CERTIFICADO DE CAPACITACIÓN PARA LA REALIZACIÓN DE LOS PROYECTOS DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

AXENCIA GALEGA DA CALIDADE ALIMENTARIA
Avda. Do Camiño Francés, 10, Baixo
15703 Santiago de Compostela
A Coruña

Xacobeo 21-22

MÓDULOS FUNDAMENTAIS OU TRONCAIS E ESPECÍFICOS CORRESPONDENTES Á FUNCIÓN "a" COIDADO DOS ANIMAIS – ORDE ECC/566/2015, DE 20 DE MARZO

MÓDULOS FUNDAMENTAIS OU TRONCAIS

1.- Lexislación nacional (1 hora).

2.- Ética, benestar animal e as "tres erres", nivel 1 (2 horas).

3.- Bioloxía básica e adecuada, nivel 1 (3 horas).

4.- Coidado, saúde e manexo dos animais, nivel 1 (5 horas).

5.- Recoñecemento da dor, o sufrimento e a angustia (3 horas).

6.- Métodos incruentos de sacrificio, nivel 1 (2 horas)

MÓDULOS ESPECÍFICOS DA FUNCIÓN "a"

1.-Bioloxía básica e adecuada, nivel 2 (3 horas)

MÓDULOS FUNDAMENTALES O TRONCALES Y ESPECÍFICOS CORRESPONDIENTES A LA FUNCIÓN "a" CUIDADO DE LOS ANIMALES – ORDEN ECC/566/2015, DE 20 DE MARZO

MÓDULOS FUNDAMENTALES O TRONCALES

1.- Legislación nacional (1 hora).

2.- Ética, bienestar animal y las "tres erres", nivel 1 (2 horas).

3.- Biología básica y adecuada, nivel 1 (3 horas).

4.- Cuidado, salud y manejo de los animales, nivel 1 (5 horas).

5.- Reconocimiento del dolor, el sufrimiento y la angustia (3 horas).

6.- Métodos incruentos de sacrificio, nivel 1 (2 horas)

MÓDULOS ESPECÍFICOS DE LA FUNCIÓN "a"

1.-Biología básica y adecuada, nivel 2 (3 horas)

CVE: GEWvMBh2kYD
Verificación: https://sede.xunta.gal/cve

AXENCIA GALEGA DA CALIDADE ALIMENTARIA

Avda. Do Camiño Francés, 10, Baixo
15703 Santiago de Compostela
A Coruña

Xacobeo 21·22

Certificado de capacitación inicial en materia de protección de animais utilizados, criados ou subministrados con fins de experimentación e outros fins científicos, incluíndo a docencia conforme coa Orde ECC/566/2015 de 20 de marzo.

Certificado de capacitación inicial en materia de protección de animales utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia conforme con la Orden ECC/566/2015 de 20 de marzo.

1. IDENTIFICACIÓN / *IDENTIFICACIÓN*

1.1. Apelidos / *Apellidos*

Cuartero Martínez

1.2. Nome / *Nombre*	DNI / *DNI*
Andrea	**77135077T**

1.3. Función / *Función*	1.4. Grupo ou grupos de especies* / *Grupo o grupos de especies**	1.5. Data inicial de vixencia** / *Fecha inicial de vigencia***
"a"	**ro**	**18/03/2022**

2. Nº DO CERTIFICADO / *Nº DEL CERTIFICADO*

a345

3.ORGANISMO QUE EXPIDE O CERTIFICADO / *ORGANISMO QUE EXPIDE EL CERTIFICADO*

3.1. Nome e enderezo do organismo que expide o certificado / *Nombre y dirección del organismo que expide el certificado*

AXENCIA GALEGA DA CALIDADE ALIMENTARIA
CONSELLERÍA DO MEDIO RURAL – XUNTA DE GALICIA
Rúa do Camiño Francés, 10 baixo
15781 Santiago de Compostela
A Coruña (España)

3.2. Teléfono / *Teléfono*	3.3. Fax / *Fax*	3.4. Correo electrónico / *Correo electrónico*
981 546 657	981 546 651	formacion.cmrm@xunta.es

3.5. Data / *Fecha*	3.6. Lugar / *Lugar*
	Santiago de Compostela

3.7. Nome e sinatura / *Nombre y firma*

Santiago de Compostela,

O director da Axencia Galega da Calidade Alimentaria

Por delegación de sinatura (Resolución do 15/02/2022)

O xefe da Área de Formación, Innovación e Investigación Agraria

Manuel López Luaces

* ro (roedores), la (lagomorfos), ca (carnívoros), ga (équidos, ruminantes e porcino), pr (primates), av (aves), re (réptiles), pa (peixes e anfibios), ce (cefalópodos), as (animais silvestres), oe (outras especies), te (tódalas especies) / * ro (roedores), la (lagomorfos), ca (carnívoros), ga (équidos, rumiantes y porcino), pr (primates), av (aves), re (reptiles), pa (peces y anfibios), ce (cefalópodos), as (animales silvestres), oe (otras especies), te (todas las especies)

** A validez deste certificado será de oito anos contados a partir da data inicial de vixencia. O mantemento da capacitación deberá solicitarse durante os oito meses anteriores á finalización do prazo de vixencia, preferiblemente entre os oito e os tres meses anteriores á finalización do mesmo. /***La validez de este certificado será de ocho años contados a partir de la fecha inicial de vigencia. El mantenimiento de la capacitación deberá solicitarse durante los ocho meses anteriores a la finalización del plazo de vigencia, preferiblemente entre los ocho y los tres meses anteriores a la finalización del mismo.*

Asinado por: LOPEZ LUACES, MANUEL
Cargo: Xefe de Área
Data e hora: 20/05/2022 16:03:16

CVE: GdWxMBKjKFD
Verificación: https://sede.xunta.gal/cve

AXENCIA GALEGA DA CALIDADE ALIMENTARIA
Avda. Do Camiño Francés, 10, Baixo
15703 Santiago de Compostela
A Coruña

Xacobeo 21·22

MÓDULOS FUNDAMENTAIS OU TRONCAIS E ESPECÍFICOS CORRESPONDENTES Á FUNCIÓN "b" EUTANASIA DOS ANIMAIS – ORDE ECC/566/2015, DE 20 DE MARZO

MÓDULOS FUNDAMENTAIS OU TRONCAIS

1.- Lexislación nacional (1 hora).

2.- Ética, benestar animal e as "tres erres", nivel 1 (2 horas).

3.- Bioloxía básica e adecuada, nivel 1 (3 horas).

4.- Coidado, saúde e manexo dos animais, nivel 1 (5 horas).

5.- Recoñecemento da dor, o sufrimento e a angustia (3 horas).

6.- Métodos incruentos de sacrificio, nivel 1 (2 horas)

MÓDULOS ESPECÍFICOS DA FUNCIÓN "b"

1.- Bioloxía básica e adecuada, nivel 2 (3 horas)

2.- Métodos incruentos de sacrificio, nivel 2 (3 horas)

.....

MÓDULOS FUNDAMENTALES O TRONCALES Y ESPECÍFICOS CORRESPONDIENTES A LA FUNCIÓN "b" EUTANASIA DE LOS ANIMALES – ORDEN ECC/566/2015, DE 20 DE MARZO

MÓDULOS FUNDAMENTALES O TRONCALES

1.- Legislación nacional (1 hora).

2.- Ética, bienestar animal y las "tres erres", nivel 1 (2 horas).

3.- Biología básica y adecuada, nivel 1 (3 horas).

4.- Cuidado, salud y manejo de los animales, nivel 1 (5 horas).

5.- Reconocimiento del dolor, el sufrimiento y la angustia (3 horas).

6.- Métodos incruentos de sacrificio, nivel 1 (2 horas)

MÓDULOS ESPECÍFICOS DE LA FUNCIÓN "b"

1.- Biología básica y adecuada, nivel 2 (3 horas)

2.- Métodos incruentos de sacrificio, nivel 2 (3 horas)

CVE: YgpIcECAPXtB
Verificación: https://sede.xunta.gal/csv
USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

AXENCIA GALEGA DA CALIDADE ALIMENTARIA

Avda. Do Camiño Francés, 10, Baixo
15703 Santiago de Compostela
A Coruña

Xacobeo 21-22

Certificado de capacitación inicial en materia de protección de animais utilizados, criados ou subministrados con fins de experimentación e outros fins científicos, incluíndo a docencia conforme coa Orde ECC/566/2015 de 20 de marzo.

Certificado de capacitación inicial en materia de protección de animales utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia conforme con la Orden ECC/566/2015 de 20 de marzo.

1. IDENTIFICACIÓN / *IDENTIFICACIÓN*

1.1. Apelidos / *Apellidos*

Cuartero Martínez

1.2. Nome / *Nombre*	DNI / *DNI*
Andrea	**77135077T**

1.3. Función / *Función*	1.4. Grupo ou grupos de especies* / *Grupo o grupos de especies**	1.5. Data inicial de vixencia** / *Fecha inicial de vigencia***
"b"	**ro**	**18/03/2022**

2. Nº DO CERTIFICADO / *Nº DEL CERTIFICADO*

b632

3.ORGANISMO QUE EXPIDE O CERTIFICADO / *ORGANISMO QUE EXPIDE EL CERTIFICADO*

3.1. Nome e enderezo do organismo que expide o certificado / *Nombre y dirección del organismo que expide el certificado*

AXENCIA GALEGA DA CALIDADE ALIMENTARIA
CONSELLERÍA DO MEDIO RURAL – XUNTA DE GALICIA
Rúa do Camiño Francés, 10 baixo
15781 Santiago de Compostela
A Coruña (España)

3.2. Teléfono / *Teléfono*	3.3. Fax / *Fax*	3.4. Correo electrónico / *Correo electrónico*
981 546 657	981 546 651	formacion.cmrm@xunta.es

3.5. Data / *Fecha*	3.6. Lugar / *Lugar*
	Santiago de Compostela

3.7. Nome e sinatura / *Nombre y firma*

Santiago de Compostela,

O director da Axencia Galega da Calidade Alimentaria

Por delegación de sinatura (Resolución do 15/02/2022)

O xefe da Área de Formación, Innovación e Investigación Agraria

Manuel López Luaces

* ro (roedores), la (lagomorfos), ca (carnívoros), ga (équidos, ruminantes e porcino), pr (primates), av (aves), re (réptiles), pa (peixes e anfibios), ce (cefalópodos), as (animais silvestres), oe (outras especies), te (tódalas especies) / * ro (roedores), la (lagomorfos), ca (carnívoros), ga (équidos, rumiantes y porcino), pr (primates), av (aves), re (reptiles), pa (peces y anfibios), ce (cefalópodos), as (animales silvestres), oe (otras especies), te (todas las especies)

** A validez deste certificado será de oito anos contados a partir da data inicial de vixencia. O mantemento da capacitación deberá solicitarse durante os oito meses anteriores á finalización do prazo de vixencia, preferiblemente entre os oito e os tres meses anteriores á finalización do mesmo. /** *La validez de este certificado será de ocho años contados a partir de la fecha inicial de vigencia. El mantenimiento de la capacitación deberá solicitarse durante los ocho meses anteriores a la finalización del plazo de vigencia, preferiblemente entre los ocho y los tres meses anteriores a la finalización del mismo.*

Asinado por: LOPEZ LUACES, MANUEL
Cargo: Xefe de Área
Data e hora: 30/06/2022 16:03:17

CVE: 1gqlicECAPXtB
Verificación: https://sede.xunta.gal/csv

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

AXENCIA GALEGA DA CALIDADE ALIMENTARIA
Avda. Do Camiño Francés, 10, Baixo
15703 Santiago de Compostela
A Coruña
Xacobeo 21·22

MÓDULOS FUNDAMENTAIS OU TRONCAIS E ESPECÍFICOS CORRESPONDENTES Á FUNCIÓN "c" REALIZACIÓN DOS PROCEDEMENTOS – ORDE ECC/566/2015, DE 20 DE MARZO

MÓDULOS FUNDAMENTAIS OU TRONCAIS

1.- Lexislación nacional (1 hora).

2.- Ética, benestar animal e as "tres erres", nivel 1 (2 horas).

3.- Bioloxía básica e adecuada, nivel 1 (3 horas).

4.- Coidado, saúde e manexo dos animais, nivel 1 (5 horas).

5.- Recoñecemento da dor, o sufrimento e a angustia (3 horas).

6.- Métodos incruentos de sacrificio, nivel 1 (2 horas)

MÓDULOS ESPECÍFICOS DA FUNCIÓN "c"

1.- Bioloxía básica e adecuada, nivel 2 (3 horas)

2.- Procedementos minimamente invasores sen anestesia, nivel 1 (5 horas)

3.- Procedementos minimamente invasores sen anestesia, nivel 2 (10 horas)

4.- Anestesia para procedementos menores (5 horas)

5.- Anestesia avanzada para intervencións cirúrxicas ou procedementos prolongados (8 horas)

6.- Principios de cirurxía (5 horas)

MÓDULOS FUNDAMENTALES O TRONCALES Y ESPECÍFICOS CORRESPONDIENTES A LA FUNCIÓN "c" REALIZACIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS – ORDEN ECC/566/2015, DE 20 DE MARZO

MÓDULOS FUNDAMENTALES O TRONCALES

1.- Legislación nacional (1 hora).

2.- Ética, bienestar animal y las "tres erres", nivel 1 (2 horas).

3.- Biología básica y adecuada, nivel 1 (3 horas).

4.- Cuidado, salud y manejo de los animales, nivel 1 (5 horas).

5.- Reconocimiento del dolor, el sufrimiento y la angustia (3 horas).

6.- Métodos incruentos de sacrificio, nivel 1 (2 horas)

MÓDULOS ESPECÍFICOS DE LA FUNCIÓN "c"

1.- Biología básica y adecuada, nivel 2 (3 horas)

2.- Procedimientos mínimamente invasivos sin anestesia, nivel 1 (5 horas)

3.- Procedimientos mínimamente invasivos sin anestesia, nivel 2 (10 horas)

4.- Anestesia para procedimientos menores (5 horas)

5.- Anestesia avanzada para intervenciones quirúrgicas o procedimientos prolongados (8 horas)

6.- Principios de cirugía (5 horas)

CVE: AgnkCdgarl01
Verificación: https://sede.xunta.gal/csv
USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

AXENCIA GALEGA DA CALIDADE ALIMENTARIA

Avda. Do Camiño Francés, 10, Baixo
15703 Santiago de Compostela
A Coruña

Xacobeo 21·22

Certificado de capacitación inicial en materia de protección de animais utilizados, criados ou subministrados con fins de experimentación e outros fins científicos, incluíndo a docencia conforme coa Orde ECC/566/2015 de 20 de marzo.

Certificado de capacitación inicial en materia de protección de animales utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia conforme con la Orden ECC/566/2015 de 20 de marzo.

1. IDENTIFICACIÓN / *IDENTIFICACIÓN*

1.1. Apelidos / *Apellidos*

Cuartero Martínez

1.2. Nome / *Nombre*	DNI / *DNI*
Andrea	**77135077T**

1.3. Función / *Función*	1.4. Grupo ou grupos de especies* / *Grupo o grupos de especies**	1.5. Data inicial de vixencia** / *Fecha inicial de vigencia***
"c"	**ro**	**18/03/2022**

2. Nº DO CERTIFICADO / *Nº DEL CERTIFICADO*

c675

3.ORGANISMO QUE EXPIDE O CERTIFICADO / *ORGANISMO QUE EXPIDE EL CERTIFICADO*

3.1. Nome e enderezo do organismo que expide o certificado / *Nombre y dirección del organismo que expide el certificado*

AXENCIA GALEGA DA CALIDADE ALIMENTARIA
CONSELLERÍA DO MEDIO RURAL – XUNTA DE GALICIA
Rúa do Camiño Francés, 10 baixo
15781 Santiago de Compostela
A Coruña (España)

3.2. Teléfono / *Teléfono*	3.3. Fax / *Fax*	3.4. Correo electrónico / *Correo electrónico*
981 546 657	981 546 651	formacion.cmrm@xunta.es

3.5. Data / *Fecha*	3.6. Lugar / *Lugar*
	Santiago de Compostela

3.7. Nome e sinatura / *Nombre y firma*

Santiago de Compostela,

O director da Axencia Galega da Calidade Alimentaria

Por delegación de sinatura (Resolución do 15/02/2022)

O xefe da Área de Formación, Innovación e Investigación Agraria

Manuel López Luaces

* ro (roedores), la (lagomorfos), ca (carnívoros), ga (équidos, ruminantes e porcino), pr (primates), av (aves), re (réptiles), pa (peixes e anfibios), ce (cefalópodos), as (animais silvestres), oe (outras especies), te (tódalas especies) / * ro (roedores), la (lagomorfos), ca (carnívoros), ga (équidos, rumiantes y porcino), pr (primates), av (aves), re (reptiles), pa (peces y anfibios), ce (cefalópodos), as (animales silvestres), oe (otras especies), te (todas las especies)

** A validez deste certificado será de oito anos contados a partir da data inicial de vixencia. O mantemento da capacitación deberá solicitarse durante os oito meses anteriores á finalización do prazo de vixencia, preferiblemente entre os oito e os tres meses anteriores á finalización do mesmo. /***La validez de este certificado será de ocho años contados a partir de la fecha inicial de vigencia. El mantenimiento de la capacitación deberá solicitarse durante los ocho meses anteriores a la finalización del plazo de vigencia, preferiblemente entre los ocho y los tres meses anteriores a la finalización del mismo.*

Asinado por: LOPEZ LUACES, MANUEL
Cargo: Xefe de Área
Data e hora: 20/06/2022 16:03:16

CVE: AgWK2qpa161
Verificación: https://sede.xunta.gal/cve

FINANCIACIÓN Y AGRADECIMIENTOS

Los estudios realizados en la presente Tesis Doctoral han sido parcialmente financiados por el Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) [PI20/00719], Axencia Galega Innovación [Grupos de Potencial Crecimiento, IN607B2020/11], Ministerio de Ciencia e Innovación de España (MICINN) [PID2022-142350OB-C21] y Xunta de Galicia [Grupo de Referencia Competitiva, ED431C 2021/26].

ARTÍCULOS DERIVADOS DE LA PRESENTE TESIS DOCTORAL

De acuerdo con la normativa para los estudios de doctorado de la Universidad de Santiago de Compostela publicada en el DOG de 16 de septiembre de 2020 por el cual se ordena la publicación 'Reglamento dos estudos de doutoramento da Universidade de Santiago de Compostela', se proporciona la información sobre los artículos derivados de esta Tesis Doctoral, así como los realizados durante la duración de la presente Tesis Doctoral que no han sido derivados de la misma.

Así mismo se ha añadido el nombre de artículo y revista en la que fueron publicados además de los nombres de los autores, año de publicación, editorial, enlace tipo DOI, factor de impacto de la revista y el cuartil del Journal Citation Report. Finalmente se ha añadido información acerca de los derechos de autor y el uso de este, así como la contribución del autor a la publicación.

- □ **TÍTULO:** Preclinical characterization of endotoxin-induced uveitis models using OCT, PET/CT and proteomics.

AUTORES Y FILIACIÓN: *Andrea Cuartero-Martínez*[a,b†], *Xurxo García-Otero* [b,c,d†], *Jessica Codesido*[a,b,c], *Noemí Gómez-Lado*[c,d], *Jesús Mateos*[a], *Susana B. Bravo*[e], *Carmen Antía Rodríguez-Fernández*[a,f], *Miguel González-Barcia*[a], *Pablo Aguiar*[c,d], *Marcos Ortega-Hortas*[g], *Francisco J. Otero-Espinar*[b,h,i], *Anxo Fernández-Ferreiro*[a]

[a] *FarmaChusLab Group, Health Research Institute of Santiago de Compostela (FIDIS), 15706 Santiago de Compostela, Spain.*

[b] *Department of Pharmacology, Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Santiago de Compostela (USC), 15782 Santiago de Compostela, Spain.*

[c] *Molecular Imaging Biomarkers and Theragnosis Lab, Center for Research in Molecular Medicine and Chronic Diseases (CiMUS), University of Santiago de Compostela (USC), Santiago de Compostela, Spain.*

[d] *Nuclear Medicine Service and Molecular Imaging Group, Health Research Institute of Santiago de Compostela (FIDIS), 15706 Santiago de Compostela, Spain.*

[e] *Proteomic Unit, Health Research Institute of Santiago de Compostela (IDIS), 1570f Santiago de Compostela, Spain.*

[f] *Ophthalmology Department, Vall d'Hebron University Hospital, (297) Barcelona, Spain.*

[g] *VARPA Group, INIBIC. Research Center CITIC, University of A Coruña, 15071 A Coruña, Spain.*

[h] *Paraquasil Group, Health Research Institute of Santiago de Compostela (IDIS), 15706 Santiago de Compostela, Spain.*

[i] *Institute of Materials (iMATUS), University of Santiago de Compostela (USC),15782 Santiago de Compostela, Spain.*

[†] Coautores



REVISTA: International Journal of Pharmaceutics

AÑO: 2024

EDITORIAL: Elsevier / ISSN: 0378-5173

ACCESO: https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2024.124516

REFERENCIA: Cuartero-Martínez A, García-Otero X, Codesido J, Gómez-Lado N, Mateos J, Bravo SB, Antía Rodríguez-Fernández C, González-Barcia M, Aguiar P, Ortega-Hortas M, Otero-Espinar FJ, Fernández-Ferreiro A. Preclinical characterization of endotoxin-induced uveitis models using OCT, PET/CT and proteomics. Int J Pharm. 2024 Jul 25:124516. doi: 10.1016/j.ijpharm.2024.124516. Epub ahead of print. PMID: 39067549.

FACTOR DE IMPACTO DE LA REVISTA: *5,3 (D1: 34/354)*

INFORMACIÓN SOBRE COPYRIGHT Y USO: "Please note that, as the author of this Elsevier article, you retain the right to include it in a thesis or dissertation,

provided it is not published commercially. Permission is not required, but please ensure that you reference the journal as the original source. For more information on this and on your other retained rights, please visit: https://www.elsevier.com/about/our-business/policies/copyright#Author-rights".

CONTRIBUCIÓN DEL AUTOR: La aportación del estudiante de doctorado de esta Tesis fue esencial en todos los artículos incluidos. El candidato contribuyó a la investigación y análisis de la información y a la redacción del manuscrito.

- **TÍTULO:** Stability of insulin eye drops in the treatment of refractory corneal ulcers

AUTORES Y FILIACIÓN: *Andrea Cuartero-Martínez[1,2], Gonzalo Hermelo-Vidal[1], Ana Castro-Balado[1,2,3], Ángeles Gómez-García[4], Miguel González-Barcia[1,3], Francisco J Otero-Espinar[2], Anxo Fernández-Ferreiro[1,3], Cristina Mondelo-García[1,3]*

[1]Clinical Pharmacology Group, Instituto de Investigación Sanitaria Santiago de Compostela (IDIS), Santiago de Compostela. Spain.
[2]Department of Pharmacology, Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela. Spain.
[3]Pharmacy Department, Área Sanitaria de Santiago de Compostela e Barbanza (SERGAS), Santiago de Compostela. Spain.
[4]Laboratory Services, Área Sanitaria de Santiago de Compostela e Barbanza (SERGAS), Santiago de Compostela. Spain.

REVISTA: Farmacia HOSPITALARIA



AÑO: 2022

EDITORIAL: Elsevier Science INC / ISSN: 1130-6343

ACCESO: https://doi.org/10.7399/fh.13293

REFERENCIA: Cuartero-Martínez A, Hermelo-Vidal G, Castro-Balado A, Gómez-García Á, González-Barcia M, Otero-Espinar FJ, Fernández-Ferreiro A, Mondelo-García C. Stability of insulin eye drops in the treatment of refractory corneal ulcers. Farm Hosp. 2022 Nov 25;46(6):335-339. English. PMID: 36520572.

FACTOR DE IMPACTO DE LA REVISTA: 1,0 (Q4: 301/354)

CONTRIBUCIÓN DEL AUTOR: La aportación del estudiante de doctorado de esta Tesis fue esencial en todos los artículos incluidos. El candidato contribuyó a la investigación y análisis de la información y a la redacción del manuscrito.

- **TÍTULO:** Cysteamine Eye Drops in Hyaluronic Acid Packaged in Innovative Single-Dose Systems: Stability and Ocular Biopermanence

AUTORES Y FILIACIÓN: *Ana Castro-Balado[1,2,3†], Enrique Bandín-Vilar[1,2,3†], Andrea Cuartero-Martínez[2†], Laura García-Quintanilla[1,2,3], Gonzalo Hermelo-Vidal[2], Xurxo García-Otero[3,4], Lorena Rodríguez-Martínez[2], Jesús Mateos[2], Manuela Hernández-Blanco[5], Pablo Aguiar[4], Irene Zarra-Ferro[1,2], Miguel González-Barcia[1,2], Cristina Mondelo-García[1,2], Francisco J Otero-Espinar3, Anxo Fernández-Ferreiro[1,2]*

[1]Pharmacy Department, University Clinical Hospital of Santiago de Compostela (SERGAS), 15706 Santiago de Compostela, Spain.
[2]Clinical Pharmacology Group, Health Research Institute of Santiago de Compostela (IDIS), 15706 Santiago de Compostela, Spain.
[3]Pharmacology, Pharmacy and Pharmaceutical Technology Department, Faculty of Pharmacy, University of Santiago de Compostela (USC), 15782 Santiago de Compostela, Spain.
[4]Molecular Imaging Group, Health Research Institute of Santiago de Compostela (IDIS), 15706 Santiago de Compostela, Spain.
[5]Microbiology Department, University Clinical Hospital of Santiago de Compostela (SERGAS), 15706 Santiago de Compostela, Spain.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Andrea Cuartero Martínez

† Coautores

REVISTA: Pharmaceutics

AÑO: 2022

EDITORIAL: MPDI / ISSN: 1999-4923

ACCESO: https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13030342

REFERENCIA: Castro-Balado A, Bandín-Vilar E, Cuartero-Martínez A, García-Quintanilla L, Hermelo-Vidal G, García-Otero X, Rodríguez-Martínez L, Mateos J, Hernández-Blanco M, Aguiar P, Zarra-Ferro I, González-Barcia M, Mondelo-García C, Otero-Espinar FJ, Fernández-Ferreiro A. Cysteamine Eye Drops in Hyaluronic Acid Packaged in Innovative Single-Dose Systems: Stability and Ocular Biopermanence. Pharmaceutics. 2022 Oct 15;14(10):2194. doi: 10.3390/pharmaceutics14102194. PMID: 36297629; PMCID: PMC9607622.

FACTOR DE IMPACTO DE LA REVISTA: 4,9 (Q1: 45/354)

INFORMACIÓN SOBRE COPYRIGHT Y USO: Information about permissions can be found on the website: https://www.mdpi.com/authors/rights where the following statement is placed:

"For all articles published in MDPI journals, copyright is retained by the authors. Articles are licensed under an open access Creative Commons CC BY 4.0 license, mediaing that anyone may download and read the paper for free. The article may be reused and quoted provided that the original published version is cited."

CONTRIBUCIÓN DEL AUTOR: La aportación del estudiante de doctorado de esta Tesis fue esencial en todos los artículos incluidos. El candidato contribuyó a la investigación y análisis de la información y a la redacción del manuscrito.

- **TÍTULO:** Cysteamine Eye Drops in Hyaluronic Acid Packaged in Innovative Single-Dose Systems, Part II: Long-Term Stability and Clinical Ocular Biopermanece

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

AUTORES Y FILIACIÓN: *Ana Castro-Balado[1,2,3†], Andrea Cuartero-Martínez[2†], Hugo Pena-Verdeal[4,5], Gonzalo Hermelo-Vidal[2], Anja Schmidt[6], Belén Montero[6], Manuela Hernández-Blanco[7], Irene Zarra-Ferro[1,2], Miguel González-Barcia[1,2], Cristina Mondelo-García[1,2], María Jesús Giráldez[4,5], Eva Yebra-Pimentel[4,5], Francisco J Otero-Espinar[3], Anxo Fernández-Ferreiro[1,2]*

[1]*Pharmacy Department, University Clinical Hospital of Santiago de Compostela (SERGAS), 15706 Santiago de Compostela, Spain.*
[2]*Clinical Pharmacology Group, Health Research Institute of Santiago de Compostela (IDIS), 15706 Santiago de Compostela, Spain.*
[3]*Pharmacology, Pharmacy and Pharmaceutical Technology Department, Faculty of Pharmacy, University of Santiago de Compostela (USC), 15782 Santiago de Compostela, Spain.*
[4]*Department of Applied Physics (Optometry), Faculty of Optics and Optometry, University of Santiago de Compostela (USC), 15782 Santiago de Compostela, Spain.*
[5]*Optometry Group, Health Research Institute of Santiago de Compostela (IDIS), 15706 Santiago de Compostela, Spain.*
[6]*Group of Polymers, Physics and Earth Sciences Department, Campus Industrial de Ferrol (CIF), CITENI, Escuela Politécnica de Ingeniería (EPEF), Universidade da Coruña, C/Mendizabal s/n, 15403 Ferrol, Spain.*
[7]*Microbiology Department, University Clinical Hospital of Santiago de Compostela (SERGAS), 15706 Santiago de Compostela, Spain.*
[†]Coautores

REVISTA: Pharmaceutics

AÑO: 2023

EDITORIAL: MPDI / ISSN: 1999-4923

ACCESO: https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15112589.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

REFERENCIA: Castro-Balado A, Cuartero-Martínez A, Pena-Verdeal H, Hermelo-Vidal G, Schmidt A, Montero B, Hernández-Blanco M, Zarra-Ferro I, González-Barcia M, Mondelo-García C, Giráldez MJ, Yebra-Pimentel E, Otero-Espinar FJ, Fernández-Ferreiro A. Cysteamine Eye Drops in Hyaluronic Acid Packaged in Innovative Single-Dose Systems, Part II: Long-Term Stability and Clinical Ocular Biopermanence. Pharmaceutics. 2023 Nov 5;15(11):2589. doi: 10.3390/pharmaceutics15112589. PMID: 38004568; PMCID: PMC10675239.

FACTOR DE IMPACTO DE LA REVISTA: 4,9 (Q1: 45/354)

INFORMACIÓN SOBRE COPYRIGHT Y USO: Information about permissions can be found on the website: https://www.mdpi.com/authors/rights where the following statement is placed:

"For all articles published in MDPI journals, copyright is retained by the authors. Articles are licensed under an open access Creative Commons CC BY 4.0 license, mediaing that anyone may download and read the paper for free. The article may be reused and quoted provided that the original published version is cited."

CONTRIBUCIÓN DEL AUTOR: La aportación del estudiante de doctorado de esta Tesis fue esencial en todos los artículos incluidos. El candidato contribuyó a la investigación y análisis de la información y a la redacción del manuscrito.

AUTORÍA DE LAS FIGURAS

El autor declara que todas las figuras no referenciadas de esta Tesis Doctoral son de autoría propia, creadas con BioRender.com, Flaticon.com y string-db.org/.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Resumen gráfico de la anatomía humana ocular y las estructuras que la componen, así como la división entre los segmentos oculares. Creado con BioRender.com. 18

Figura 2. Esquema de las diferentes capas de la retina neurosensorial. La capa más externa (epitelio pigmentario de la retina) está en contacto con la coroides mientras que la capa más interna (membrana limitante interna) se encuentra en contacto directo con la cavidad vítrea. Creado con BioRender.com. 19

Figura 3. Comparativa de tamaño y anatomía del globo ocular de un humano frente a los dos grupos de roedores que más se emplean en investigación preclínica como es el ratón y la rata. Creado con BioRender.com. 20

Figura 4. Representación esquemática del principio de funcionamiento de la interferometría de coherencia óptica que emplea el OCT. Creado con BioRender.com. 36

Figura 5. Fotografía del dispositivo Spectralis® OCT. En la imagen se observa el instrumento OCT adaptado para poder evaluar roedores pequeños como ratón y rata. Para ello se sustituyó la mentonera habitual por una plataforma de poliestireno expandido..... 38

Figura 6. Imagen representativa del tipo de señal que proporciona el tejido y su equivalencia en la escala de grises. Como se observa, las estructuras o tejidos que producen señales altas de OCT serán aquellas que en la imagen de OCT den una imagen más blanca debido a su hiperreflectividad. Al contrario, los tejidos y estructuras que devuelven una señal baja devolverán una imagen más oscura ya que se produce un fenómeno de hiporreflectividad..... 39

Figura 7. Imagen representativa de OCT de las zonas hiperreflectivas e hiporreflectivas del segmento anterior (A) y segmento posterior (B) de un ratón. Las zonas hiperreflectivas darán una señal más blanca mientras que las zonas hiporreflectivas proporcionarán una menor señal incluso llegando al negro. CCG: capa células ganglionares; CFE: sector externo de la capa de fotorreceptores; CFI: sector interno de la capa de fotorreceptores; CNE: capa nuclear externa; CNI: capa

nuclear interna; CPE: capa plexiforme externa; CPI: capa plexiforme interna; EPE: epitelio pigmentario de la retina; RNFL: capa de fibras nerviosas de la retina.... 40

Figura 8. Imagen comparativa entre las estructuras del ojo que pueden observarse por imagen OCT de un humano y un roedor. a) Imagen de OCT de segmento anterior de una córnea sana humana. Imagen obtenida de Ang *et al.* (145). b) Imagen de OCT propia del segmento anterior de una rata Sprague Dawley sana. c) Imagen de la retina de un paciente diagnosticado de hipoplasia foveal. Imagen subida por el Dr. Steven M. Cohen, MD y fue obtenida de la biblioteca de imágenes y vídeos de retina gratuitos y sin derechos de autor de Retina Gallery. d) Imagen de OCT propia de la retina de un ratón sano. 42

Figura 9. Representación esquemática de los procesos necesarios para poder obtener la imagen PET. Inicialmente un átomo inestable con más protones en su núcleo que neutrones producirá un fenómeno de desintegración beta para poder llegar al equilibrio. Durante esa desintegración, los protones sobrantes se convertirán en neutrones y generarán positrones. Tras esto, los positrones chocarán con los electrones y se producirá la aniquilación de ambas partículas, produciéndose dos fotones que serán captados por los detectores del anillo del PET. Creado con BioRender.com. 43

Figura 10. Resumen gráfico donde se observan los estudios realizados en la caracterización preclínica del modelo de uveítis por inducción de endotoxina usando OCT, PET/CT y proteómica. AS-OCT: tomografía de coherencia óptica de segmento anterior; C: grupo control ratas sanas; Ci: grupo BSS intravítreo; LPSi: grupo EIU intravítreo; LPSs: grupo EIU sistémico; PET/CT: tomografía de emisión de positrones y tomografía computerizada; PIO: presión intraocular. Creado con BioRender.com. 63

Figura 11. Diseño experimental de los diferentes estudios: A) Mediciones de PIO, estudios de imagen AS-OCT y proteómica para los cuatro grupos experimentales (control (C), control intravítreo (Ci), uveítis inducida por vía sistémica (LPS) y uveítis inducida por administración intravítrea (LPSi)). B) Estudios de imagen PET/CT. Inducciones del grupo control (C) y del modelo EIU de los grupos LPS y LPSi, administración intravenosa de ^{18}F-FDG y adquisiciones PET/CT. Creado con BioRender.com. 65

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Figura 12. Ensayo in vivo y video ejemplo explicativo de los procedimientos de PIO y OCT (código QR)..... 65

Figura 13. Resumen gráfico donde se observan el diseño del estudio realizado para la caracterización preclínica del modelo tauopatía con técnicas de OCT. NCAR: ratonas no portadoras del gen P301S; P301S: ratonas hemicigóticas modificadas genéticamente para expresar el gen humano P301S. Creado con BioRender.com. 74

Figura 14. Imagen del fenotipo de los ratones PS19 obtenida del sitio web de https://www.jax.org/strain/008169. 75

Figura 15. Diseño experimental del estudio longitudinal para los diferentes tiempos analizados. NCAR: ratonas no portadoras del gen P301S; OCT: tomografía de coherencia óptica; PIO: presión intraocular; P301S: ratonas hemicigóticas modificados genéticamente para expresar el gen humano P301S. Creado con Biorender.com. 77

Figura 16. Lente de contacto rígida gas permeable empleada en el estudio de la retina de ratones para la caracterización del modelo de tauopatía. A la izquierda se encuentra la lente de contacto colocada en el dedo donde se puede comparar el tamaño con el dedo humano. A la derecha se encuentra el lentillero donde se guardan las lentillas una vez acaba la adquisición y los parámetros de esta. 79

Figura 17. Imagen representativa de la segmentación de las capas de la retina analizadas y localización de las células. 80

Figura 18. Imágenes representativas de los sectores empleados en el análisis del espesor retiniano de las diferentes capas estudiadas. a) Sectores del círculo ETDR de 3, 2, 1, mm de tamaño. b) Imagen representativa del círculo ETDR centrado en el nervio óptico mostrando los sectores centrales, internos y externos. c) Sectores analizados en el protocolo circular empleado para analizar la capa pRNFL. I1: inferior interno; I2: inferior externo; IN: inferonasal, IT: inferotemporal; N1: nasal interno; N2: nasal externo; N: nasal; S1: superior interno; S2: superior externo; SN: superonasal; ST: superotemporal; T1: temporal interno; T2: temporal externo; T: temporal. 80

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Figura 19. Variaciones de la presión intraocular medidas en diferentes momentos temporales en los diferentes grupos analizados. A) Análisis comparativo pareado intragrupo de la presión intraocular (prueba de comparaciones múltiples de Sidak). Pre: antes de la inducción; Post: 24 horas después de la inducción. B) Análisis comparativo no apareado entre grupos de la presión intraocular (prueba de comparaciones múltiples de Tukey); *: significancia estadísticaα<0,05; **: significancia estadísticaα<0,01. 83

Figura 20. Imágenes in vivo de la cámara anterior del ojo de rata. A) Sección media inferior de la cámara anterior de una rata control sana sin hallazgos inflamatorios relevantes. B) Sección media de la cámara anterior de ratas a las que se les administró BSS por vía intravítrea 24 horas después de la administración. C) Sección media baja de ratas inducidas con LPS sistémico 24 horas después de la administración. D) Sección media de la cámara anterior de ratas inducidas con LPS intravítreo 24 horas después de la administración. *blanco: infiltrado celular; *magenta: acumulación de células; *verde: membrana fibrótica; *azul: inflamación del iris. 85

Figura 21. Análisis proteómico de la comparación entre los grupos de EIU analizados (código QR). 87

Figura 22. 'Volcano plot' de las proteínas modulaas en las diferentes comparaciones realizadas. a) LPSi vs LPSs; b) C vs LPSi; c) C vs LPSs. 87

Figura 23. Análisis de ontología genética y de redes de la comparación LPSi vs LPSs. 88

Figura 24. Análisis de ontología genética y de redes de la comparación C vs LPSi. .. 89

Figura 25. Imágenes coronales fusionadas de PET/CT de cabezas de ratas para los grupos escaneados. La escala de colores representó la absorción de 18F-FDG desde una intensidad más baja (azul) hasta una más alta (rojo). FDG-C: grupo control sano; FDG-LPSi: grupo EIU intravítreo; FDG-LPSs: grupo EIU sistémico; SUV: valor de absorción estandarizado. 90

Figura 26. Valores de SUV y desviación estándar de los órganos evaluados en los diferentes modelos realizados y su comparación entre grupos. FDG-C: grupo

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

control sano; FDG-LPSi: grupo EIU intravítreo; FDG-LPSs: grupo EIU sistémico; SUV: valor de absorción estandarizado; *:α<0,05; ***:α<0,001 y ****:α<0,0001. 91

Figura 27. Comparativa longitudinal entre grupos de la presión intraocular a 12, 24, 36, 48 semanas de edad. NCAR: ratonas no portadoras del gen P301S; PIO: presión intraocular; P301S: ratonas hemicigóticas modificadas genéticamente para expresar el gen humano P301S..... 97

Figura 28. Comparativa intragrupo de la presión intraocular a 12, 24, 36, 48 semanas de edad. NCAR: ratonas no portadoras del gen P301S; PIO: presión intraocular; P301S: ratonas hemicigóticas modificadas genéticamente para expresar el gen humano P301S. 98

Figura 29. Imágenes representativas del fondo de ojo de las retinas de los animales NCAR y P301S analizadas en los diferentes puntos temporales evaluados. En el centro de las imágenes, el nervio óptico se muestra como un círculo blanco hiperreflectivo y se pueden ver las diferentes arcadas vasculares como líneas blancas hiperreflectivas que se expanden desde el nervio óptico. En amarillo están remarcadas las zonas donde se encuentran los puntos blancos hiperreflectivos. NCAR: ratones no portadores del gen P301S P3901S; OD: ojo derecho; OS: ojo izquierdo. 99

Figura 30. Imágenes OCT longitudinales representativas de las exploraciones centradas en el nervio óptico del grupo NCAR. El área analizada y la dirección de la adquisición se indican con un rectángulo verde y una flecha, respectivamente. 101

Figura 31. Imágenes OCT longitudinales representativas de las exploraciones del grupo P301S. El área analizada y la dirección de la adquisición se indican con un rectángulo verde y una flecha, respectivamente. 102

Figura 32. Valores medios, desviación estándar y comparación del grosor de la capa de fibras nerviosas de la retina peripapilar en diferentes untos temporales y sectores evaluados. NCAR: ratones no portadores; P301S: ratones modificados genéticamente c con el gen humano P301S. *: valor α <0,05. 103

Figura 33. Valores medios, desviación estándar y comparación del grosor total de la retina en diferentes puntos temporales y sectores evaluados. I1: sector inferior

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

interno; I2: sector inferior externo; N1: sector nasal interno; N2: sector nasal externo; S1: sector superior interno; S2: sector superior externo; T1: sector temporal interno; T2: sector temporal externo; NCAR: ratones no portadores; P301S: ratones modificados genéticamente con el gen humano P301S; *: valor p<0,05..... 104

Figura 34. Valores medios, desviación estándar y comparación del grosor de la capa de células ganglionares en diferentes puntos temporales y sectores evaluados. I1: sector inferior interno; I2: sector inferior externo; N1: sector nasal interno; N2: sector nasal externo; S1: sector superior interno; S2: sector superior externo; T1: sector temporal interno; T2: sector temporal externo;. NCAR: ratones no portadores; P301S: ratones modificados genéticamente con el gen humano P301S; *: valor p<0,05 105

Figura 35. Valores medios, desviación estándar y comparación del grosor de la capa plexiforme interna en diferentes puntos temporales y sectores evaluados. I1: sector inferior interno; I2: sector inferior externo; N1: sector nasal interno; N2: sector nasal externo; S1: sector superior interno; S2: sector superior externo; T1: sector temporal interno; T2: sector temporal externo; NCAR: ratones no portadores; P301S: ratones modificados genéticamente con el gen humano P301S; *: valor α <0,05..... 106

Figura 36. Valores medios, desviación estándar y comparación del grosor de la capa nuclear interna en diferentes puntos temporales y sectores evaluados. I1: sector inferior interno; I2: sector inferior externo; N1: sector nasal interno; N2: sector nasal externo; S1: sector superior interno; S2: sector superior externo; T1: sector temporal interno; T2: sector temporal externo; NCAR: ratones no portadores; P301S: ratones modificados genéticamente con el gen humano P301S; *: valor α <0,05..... 107

Figura 37. Valores medios, desviación estándar y comparación del grosor de la capa plexiforme externa en diferentes puntos temporales y sectores evaluados. I1: sector inferior interno; I2: sector inferior externo; N1: sector nasal interno; N2: sector nasal externo; S1: sector superior interno; S2: sector superior externo; T1: sector temporal interno; T2: sector temporal externo; NCAR: ratones no portadores; P301S: ratones modificados genéticamente con el gen humano P301S; *: valor α <0,05..... 108

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Figura 38. Valores medios, desviación estándar y comparación del grosor de la capa nuclear externa en diferentes puntos temporales y sectores evaluados. I1: sector inferior interno; I2: sector inferior externo; N1: sector nasal interno; N2: sector nasal externo; S1: sector superior interno; S2: sector superior externo; T1: sector temporal interno; T2: sector temporal externo; NCAR: ratones no portadores; P301S: ratones modificados genéticamente con el gen humano P301S; *: valor α <0,05..... 109

Figura 39. Valores medios, desviación estándar y comparación del grosor del epitelio pigmentario de la retina en diferentes puntos temporales y sectores evaluados. I1: sector inferior interno; I2: sector inferior externo; N1: sector nasal interno; N2: sector nasal externo; S1: sector superior interno; S2: sector superior externo; T1: sector temporal interno; T2: sector temporal externo;; NCAR: ratones no portadores; P301S: ratones modificados genéticamente con el gen humano P301S; *: valor α<0,05..... 110

Tabla 1. Clasificación de la enfermedad de uveítis según el grupo de trabajo SUN dependiendo de la zona anatómica afectada y el curso clínico de la enfermedad. 56

Tabla 2. Valores medio de espesor, desviación estándar y análisis intergrupo en μm para ambos ojos de ratones P301S y NCAR a las 12, 24, 36 y 48 semanas para la capa de fibras nerviosas de la retina en la zona peripapilar..... 116

Tabla 3. Valores medio de espesor, desviación estándar y análisis intergrupo en μm para ambos ojos de ratones P301S y NCAR a las 12, 24, 36 y 48 semanas para el espesor total de la retina. 117

Tabla 4. Valores medio de espesor, desviación estándar y análisis intergrupo en μm para ambos ojos de ratones P301S y NCAR a las 12, 24, 36 y 48 semanas para la capa de células ganglionares. 118

Tabla 5. Valores medio de espesor, desviación estándar y análisis intergrupo en μm para ambos ojos de ratones P301S y NCAR a las 12, 24, 36 y 48 semanas para la capa plexiforme interna. 119

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 6. Valores medio de espesor, desviación estándar y análisis intergrupo en μm para ambos ojos de ratones P301S y NCAR a las 12, 24, 36 y 48 semanas para la capa nuclear interna..... 120

Tabla 7. Valores medio de espesor, desviación estándar y análisis intergrupo en μm para ambos ojos de ratones P301S y NCAR a las 12, 24, 36 y 48 semanas para la capa plexiforme externa. 121

Tabla 8. Valores medio de espesor, desviación estándar y análisis intergrupo en μm para ambos ojos de ratones P301S y NCAR a las 12, 24, 36 y 48 semanas para la capa nuclear externa. 122

Tabla 9. Valores medio de espesor, desviación estándar y análisis intergrupo en μm para ambos ojos de ratones P301S y NCAR a las 12, 24, 36 y 48 semanas para el epitelio pigmentario de la retina..... 123

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA





La investigación biosanitaria se enfoca en problemas de salud actuales, destacando su importancia para la investigación traslacional en las patologías oftálmicas, las cuales afectan a la calidad de vida global. La enfermedad de Alzheimer (EA) y la uveítis son ejemplos donde la falta de tratamientos efectivos destaca la necesidad de investigación en biomedicina. Herramientas como la tomografía de coherencia óptica (OCT), la tomografía por emisión de positrones (PET) o la proteómica pueden ser útiles para hallar biomarcadores que faciliten el diagnóstico y desarrollo de terapias personalizadas. El objetivo de la actual Tesis de Doctorado se centra en caracterizar modelos animales con afectación ocular mediante sistemas de imágenes no invasivas como es la OCT y el PET, y buscar biomarcadores moleculares específicos mediante el uso de la proteómica.