

**Universidad CEU Cardenal Herrera
CEINDO – CEU Escuela
Internacional de Doctorado**

PROGRAMA en CIENCIA y TECNOLOGIA DE LA SALUD



CEU

*Escuela Internacional
de Doctorado*

**Mecanismos fisiopatológicos en
degeneraciones de la retina: retinosis
pigmentaria y miopía**

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

Roberto Gimeno Hernández

Dirigida por: Dr. María Miranda Sanz

Dr. Francisco Bosch Morell

VALENCIA

2019

Mecanismos fisiopatológicos en degeneraciones de la retina: retinosis pigmentaria y miopía



CEU

*Universidad
Cardenal Herrera*

Roberto Gimeno
Hernández

Departamento de Ciencias
Biomédicas

Universidad Cardenal Herrera
CEU

Dirigida por
Dra. D^a María Miranda
Dr. D Francisco Bosch

Valencia, 2019

Autorización de los directores de la Tesis Doctoral para su presentación

Los doctores **Dña. María Miranda Sanz** y **D. Francisco Bosch Morell**, profesores del departamento de Ciencias Biomédicas de la Universidad CEU Cardenal Herrera certifican:

Que la presente Tesis Doctoral titulada “**Mecanismos fisiopatológicos en degeneraciones de la retina: retinosis pigmentaria y miopía**” de la que es autor D. Roberto Gimeno Hernández, Graduado en Farmacia y Óptica y Optometría, ha sido realizada bajo nuestra dirección en el **departamento de Ciencias Biomédicas de la Universidad CEU Cardenal Herrera** dentro del programa de doctorado Ciencia y Tecnología de la Salud y que reúne todas las condiciones académicas, científicas y formales necesarias para ser presentada ante el tribunal calificador correspondiente a fin de optar al Grado de Doctor en Farmacia dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, y en cumplimiento de la legislación vigente, firmamos la presente.

En Valencia, a 29 de noviembre de 2019

Los directores de la Tesis Doctoral:

Fdo.: Dr. Francisco Bosch Morell

Fdo.: Dra. María Miranda Sanz

Dedicatoria

Esta tesis está dedicada a Marta y a mi familia.

Abstract

Degenerative diseases and among them those that affect the visual system, represent a huge problem for the society. This problem becomes even more important with the aging of the population.

The proposed project aims to improve the quality of life of the patients by knowing the pathophysiological basis of two diseases that affect the vision: retinitis pigmentosa and myopia. The visual loss is an indisputable decrease in the quality of life and the consequences are not only restricted on a personal level, but also on a social and economic level. For all these reasons, new treatments in this diseases are urgently and precisely needed and the knowledge of the mechanisms underlying.

Retinitis pigmentosa (RP) is a frequent form of retinal degeneration that is the main genetic cause of blindness in developed countries. Genetic mutations are responsible for the death of the rods. However, the death of the cones seems to occur due to the metabolic changes caused by the degeneration of the rods such as hyperoxia (oxidative stress), the secretion of various factors (cytokines, chemokines) by sticks, and so on. The death of the cones causes the loss of the central vision in RP. For this, firstly, the antioxidant response was analyzed and also the presence of oxidative stress markers in the retina of the mice with RP that could be involved in the progression or in the delay of the disease. Secondly, the expression of the glia and various growth factors were analyzed by immunohistochemistry and western blot. Finally, thioredoxin (TRX), a potent antioxidant with anti-inflammatory power, was intraperitoneally administered. We evaluated the effect of TRX on the progression of retinal degeneration in the RP model, the rd1 mouse.

The results obtained in this study show that the mice with RP have a deficient antioxidant response in the retina. The mice with the treatment showed better antioxidant response, with high levels of GSH, suggesting a role of oxidative stress in the progression of the disease. Otherwise, no modification of the expression of VEGF and a tendency to increase in HGF levels was observed in the retina, with and without treatment. In the retina of these mice, a reduction in some parameters of glial activation is observed. In rd1 mice, treatment with thioredoxin, antioxidant, anti-inflammatory and antiapoptotic, reduces the reactive gliosis to postnatal day 11 and 17.

In short, these results confirm the hypothesis that alterations of the antioxidant system and inflammatory processes in RP are involved in the pathogenesis of the disease. Treatments of endogenous antioxidants such as TRX can be useful for the search of therapeutic targets that prevent or delay the death of photoreceptors. Our results suggest that in RP, oxidative stress, active gliosis and apoptosis, among others, play an important role in the death of retinal cells. The design of strategies that promote their blockade can be promising therapies in PR.

Otherwise, myopia is an optical problem of defocusing which is due to a mismatch between the axial length of the eyeball and the lenses that comprise it. Myopia is also a medical problem that predisposes people who bear it, to suffer more frequently other ocular pathologies: retinal detachments, glaucoma, cataracts among others. There are basically two types of myopia with a very different prognosis, although the limits between both are not clearly defined. The parameter that most correlates with them is the axial length, being recognized as more appropriate to fix in 26mm the limit between both. Above these values we speak of high myopia (AM). This type of myopia is characterized by a progressive elongation of the eyeball uninterrupted during life. It is accompanied by progressive atrophy of ocular tissues and leads to blindness over the years in a large percentage of the affected population. The genetic has linked several growth factors with AM. For it, some growth factors, VEGF and HGF, were determined in patient eye samples. Thus, these factors can be related to their clinic and structural changes in the retina of these patients. The knowledge of the biochemical and molecular aspects that accompany these clinical stages will allow us to understand in depth the process and be able to find points of therapeutic approach.

The results obtained in this study show that patients with AM have a poor antioxidant response in the aqueous humor. Patients with high myopia had higher levels of HGF as the degree of retinal degeneration increased, quite the opposite of what happened with VEGF, a growth factor that significantly decreases in patients with high myopia.

Resumen

Las enfermedades degenerativas, y entre ellas las que afectan al sistema visual, representan un enorme problema para la sociedad, problema que será aún más importante con el envejecimiento de la población.

El proyecto propuesto pretende mejorar la calidad de vida de los pacientes conociendo las bases fisiopatológicas de dos enfermedades que afectan a la visión: la Retinosis Pigmentaria (RP) y la miopía. La pérdida visual constituye una indiscutible disminución de la calidad de vida y las consecuencias no están sólo restringidas a nivel personal sino también a nivel social y económico. Por todo ello, son necesarios nuevos tratamientos en este tipo de enfermedades de forma urgente y precisa, y el conocimiento de los mecanismos subyacentes a estas enfermedades nos ayudará a encontrar estos tratamientos.

La RP es una forma frecuente de degeneración retiniana que constituye la principal causa genética de ceguera en los países desarrollados. Las mutaciones genéticas son las responsables de la muerte de los bastones, los fotorreceptores situados mayoritariamente en la zona de la periferia. Sin embargo, la muerte de los conos parece que se produce debida a los cambios metabólicos que provoca la degeneración de los bastones como la hiperoxia (estrés oxidativo), la secreción de diversos factores (citoquinas, quimioquinas) por parte de los bastones, etc. La muerte de los conos provoca la pérdida de la visión central en RP. Para ello, en primer lugar, se analizó la respuesta antioxidante, la presencia de marcadores de estrés oxidativo en retina de ratones con RP que pudiesen estar implicados en la progresión o en el retraso de la enfermedad. En segundo lugar, se analizó la expresión de la glía y de diversos factores de crecimiento mediante inmunohistoquímica y western blot. Por último, se administró intraperitonealmente tiorredoxina (TRX), un potente antioxidante con poder antiinflamatorio. Se evaluó el efecto de la TRX sobre la progresión de la degeneración retiniana en un modelo de RP, el ratón rd1.

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que los ratones con RP presentan una deficiente respuesta antioxidante en la retina. Los ratones con el tratamiento mostraban mejor respuesta antioxidante, con niveles elevados de GSH, sugiriendo un papel del estrés oxidativo en la progresión de la enfermedad. Por otro lado, no se observó ninguna modificación de la expresión de VEGF y se observó una tendencia

al aumento en los niveles de HGF en la retina de los ratones rd1, con y sin tratamiento. Con el tratamiento de TRX, en la retina de estos ratones se observa una reducción en algunos parámetros de la activación glial. En el ratón rd1, el tratamiento con TRX, reduce la gliosis reactiva a día postnatal 11 y 17.

En definitiva, estos resultados confirman la hipótesis de que alteraciones del sistema antioxidante y los procesos inflamatorios en la RP están implicados en la patogénesis de la enfermedad. Tratamientos de antioxidantes endógenos como la TRX pueden ser útiles para la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas que retrasen la muerte de los fotorreceptores. Nuestros resultados sugieren que en la RP el estrés oxidativo, la gliosis activa y la muerte celular entre otros, desempeñan un papel importante en la muerte de los fotorreceptores.

Por otra parte, la miopía es un problema óptico de desenfoque que se debe a un desajuste entre la Longitud Axial (LA) del globo ocular y las lentes que lo componen. También es un problema médico que predispone a las personas que la padecen a sufrir con mayor frecuencia otras patologías oculares, tales como desprendimientos de retina, glaucoma y cataratas entre otras. Existen fundamentalmente dos tipos de miopía con pronóstico bien distinto, aunque los límites entre ambas no están netamente definidos. El parámetro que más se correlaciona con ellos es la LA, reconociéndose como más adecuado fijar en 26mm el límite entre ambas. Por encima de estos valores hablamos de Alta Miopía (AM). Este tipo de miopía se caracteriza por un alargamiento progresivo del globo ocular ininterrumpido durante la vida. Se acompaña de atrofia progresiva de los tejidos oculares y lleva a la ceguera con los años en un gran porcentaje de la población afectada. La genética ha relacionado varios factores de crecimiento con la AM. Por eso, se determinaron algunos factores de crecimiento, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), en muestras de humor acuoso de los pacientes. Así, se pueden relacionar estos factores con su clínica y los cambios estructurales que suceden en la retina de estos pacientes. El conocimiento de los aspectos bioquímicos y moleculares que acompañan estos estadios clínicos nos permitirá entender en profundidad el proceso de la enfermedad y poder encontrar puntos de abordaje terapéutico.

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que los pacientes con AM presentan una deficiente respuesta antioxidante en el humor acuoso. Los pacientes con alta miopía presentaban unos niveles mayores de HGF a medida que aumentaba el grado de degeneración de la retina, todo lo contrario que sucedía con el VEGF, factor de crecimiento que disminuye significativamente en los pacientes con alta miopía.

Agradecimientos

Este apartado es el pequeño hueco que me deja la tesis para agradecer a toda la gente que de alguna manera ha hecho posible que esta tesis exista, y que sin ellos no hubiera sido posible. Así que empecemos.

Llevo mucho tiempo queriendo llegar al final de la tesis y ya se acaba. Ha llegado el final. Pero con una sonrisa de oreja a oreja. Quizá tengo añoranza por todo lo que dejo atrás, pero en el fondo eso es bueno, significa que han pasado buenos momentos a lo largo de esta etapa inolvidable de la vida.

Dicen que en la vida hay que arriesgarse a hacer cosas nuevas. Si aciertas será tu recompensa; si te equivocas, será una lección. Pues bien, acabo estos años con una gran recompensa que me ha enseñado mucho para toda la vida. Ahora que ha llegado el final de la tesis doctoral, en mí quedan plasmados numerosos momentos y personas que siempre recordaré. Si tuviera que contar todo lo que he vivido durante esta etapa que no olvidaré nunca, probablemente no tendría folios suficientes para plasmarlo, pero intentaré hacerlo lo mejor que pueda.

Empezaré expresando mi más sincero y profundo agradecimiento en primer lugar a mis directores de tesis, los doctores María Miranda y Francisco Bosch, los cuales han permitido la realización de este trabajo y, por haberme brindado la oportunidad de introducirme en el mundo de la investigación. Quiero empezar con la Dra. María Miranda. Gracias por la confianza que has depositado en mí para realizar esta tesis durante estos años. Gracias por tu ciencia, por tu paciencia y por tus ideas, por tu infinita ayuda, pero sobre todo gracias a tu extraordinaria calidad humana. De ti he aprendido mucho científicamente y más sobre cómo ser mejor persona. De no haber sido por tu dedicación y empeño, esta tesis no habría sido posible. Además, he de agradecerte tu gran paciencia, tus consejos y también tus críticas que me han ayudado a mejorar día a día. Gracias por todo lo que me has enseñado. Gracias también a ti Paco, por haberme alentado en los momentos más difíciles, siempre con una sonrisa, por tu inestimable paciencia desde mis primeros pasos en la investigación y el apoyo y motivación recibidos. Gracias por todo lo que me has enseñado, por animarme en los momentos de bajón, por escucharme siempre que he necesitado desahogarme, por darme siempre buenos consejos. Gracias por el interés por enseñarme a hacer ciencia, y sobre todo el ánimo y la motivación para superarme día tras día. Ninguna de las palabras y frases de agradecimiento podrían bastar para agradeceros todo lo que habéis hecho por mí a nivel personal y profesional. Gracias por inculcarme la visión crítica de la ciencia, a dudar, a preguntarme el porqué de todo, a buscar soluciones y a trabajar meticulosamente.

En segundo lugar, quiero hacer extensivo también mi agradecimiento a mis compañeros del equipo de investigación de fisiología del departamento de Ciencias Biomédicas al que tengo la fortuna y el placer de pertenecer. Empezando por la Dra. Inmaculada Almansa, gracias por echarme una mano cada vez que lo necesitaba, por aportar su punto de vista sobre cualquier tema. Gracias porque siempre me has apoyado y me has dado ese empujoncito hacia delante cuando no salían los experimentos. A la Dra. Rosa López, gracias por iniciarme en el arte de llevar a cabo un protocolo con una metodología escrupulosa. A la profesora Dra. Teresa Olivar, gracias por estar siempre dispuesta a ayudar. Gracias por ofrecerme apoyo dentro y fuera del laboratorio, con el que tantísimo he aprendido. Al Dr. Vicente Hernández, por fomentar el debate científico sano e inteligente, por estar en todo momento dispuesto a echar una mano. A Ángel Fernández, por compartir preocupaciones y alegrías. Gracias por tu complicidad y amistad, las horas se pasan mucho más rápido cuando tienes un amigo compartiendo bancada de laboratorio. Gracias por el día a día. Gracias por tantas cosas que me has enseñado, por estar ahí para todo, en los momentos buenos y en los malos. Es un orgullo haber aprendido estos años a tu lado. A Anto Cantó, gracias por estar ahí para lo que hiciera falta, por tu amistad. Y por supuesto, gracias a todos mis compañeros que me precedieron. A la Dra. Dolores Tania Ramírez, gracias por su espíritu alegre y activo, por compartir sus conocimientos conmigo. A la Dra. Soledad Benlloch, muchísimas gracias por enseñarme a trabajar con constancia y rigor científico. A la Dra. Esther Carrascosa, que siempre me ha echado una mano cuando lo he necesitado.

También quiero agradecer a todos los miembros del equipo de miopía. En especial al profesor Dr. Salvador Mérida, por su ayuda y enseñanzas. En especial quiero mencionar también a la oftalmóloga, profesora y Dra. Amparo Navea y a todo el equipo de la Clínica de la Retina en Valencia, por su confianza, explicaciones y por su cariño y apoyo. A Quique García, por todo lo que hemos compartido. Gracias por estar ahí para todo. Gracias por contagiarme la ilusión y el tesón que le pones a todo y por tu tenacidad incansable.

A todos los miembros del laboratorio donde realicé mi estancia, el laboratorio dirigido por el prestigioso investigador el Prof. Francisco Ambrosio en la Facultad de Medicina de la Universidad de Coímbra (Portugal). Gracias por hacerme sentir como uno más del laboratorio desde el primer día, por ayudarme. Y gracias también a todo el laboratorio del ICBR (Institute for Clinical and Biomedical Research). Todos ellos me hicieron sencillo el complejo mundo del glaucoma y me enseñaron a desenvolverme en la vida del cultivo celular.

Gracias a los técnicos de la universidad. Más a Vanesa, Cristina y Rocío, que siempre dejan lo que están haciendo para ayudarme cuando tengo algún problema.

Y por supuesto, gracias a todos mis compañeros de los laboratorios, tanto a los presentes como a los pasados, por todos los momentos vividos dentro y fuera del laboratorio. A las chicas de Anatomía Patológica: Asunción Muñoz, Sara Pérez y Elena Moreno, que tanto me habéis ayudado siempre que lo he necesitado. A todos los miembros del laboratorio de tecnología farmacéutica: Adrián Alambiaga, mi compañero de fatigas con el HPLC y a María Sebastián, una de las personas más solidarias que conozco. Con su energía desbordante, siempre dispuesta a ayudarme con una sonrisa.

A la sabiduría del equipo de bioquímica, A Josep Escrivá, Teresa León y a Cristina Cueto. Habéis hecho que los años de doctorado fueran más llevaderos. Gracias a las cañas y las risas que hemos compartido. Gracias Josep por tus buenos y sabios consejos. Gracias por tus ánimos, por tus ideas y soluciones cuando me nublo. Gracias Teresa por estar siempre ahí, dispuesta a ayudarme, por preocuparte siempre de cómo me iba todo. A Cristina, una gran científica, por contagiarme todos los días su energía. Gracias por compartir preocupaciones y nervios, por animarme en todo momento.

Gracias a todos mis amigos que han estado escuchando mis penas y alegrías estos años. De verdad, sois unos amigos verdaderos, cuya amistad y compañía es y será un privilegio para toda mi vida.

A toda mi familia, gracias por enseñarme a luchar y a sonreír en las situaciones más complicadas. Gracias por ser ese soporte incondicional que siempre me ha apoyado para hacer lo que me ilusiona. Sin duda, esta tesis también es vuestra. Especialmente a mis padres, gracias por apoyar mis decisiones, por ayudarme siempre. Gracias por estar ahí, por animarme y por aconsejarme. No hay palabras para contarlos. Vuestro amor, cariño, ayuda y paciencia para aguantarme han sido tan grandes, que, sin vosotros no habría sido posible nada de esto. Os debo todo porque todo me lo habéis dado. Empezaré por ella.

Dos palabras, siete letras y una perfección. Mi madre, Roberta. Existen muchos términos para definir a mi madre. Y cuando me decido a hacerlo, no sé ni por dónde empezar. Pero lo que sí sé, es que te mereces todo. No sabes cuánto te quiero y te querré siempre. Aunque eso sí, debes imaginártelo fenomenal porque no hay persona en este mundo que sea capaz de amar tan inmensamente como tú lo haces. Lo estoy intentando, lo prometo, pero soy incapaz de expresar lo que siento cuando pienso en ti. Ser tu hijo es un privilegio. Tu insistencia, tu fortaleza y tu constancia siempre es la culpable de que no me conforme con cualquier cosa, de que siempre quiera más y mejor, y de que haya conseguido finalizar la tesis. Eres una gran madre. El papel de madre lo has bordado y lo sigues bordando día tras día.

Gracias también a mi padre, Roberto. Sin duda, el mejor padre del mundo. Me podría tirar horas y horas escribiendo de todo en lo que es el mejor padre del mundo, pero no acabaría. Te admiro enormemente y de ti me llevo grandes valores. El que más: la nobleza de tu corazón. Tu discreción, tu tono siempre calmado, tu sonrisa amable... Has puesto sudor y lágrimas en cada paso, nos has educado a mis hermanas y a mí de la mejor forma posible y has conseguido que te miremos y se nos escape una sonrisa de oreja a oreja. Siempre has estado ahí, presente, apoyándome en todas las cosas. Es un verdadero honor ser tu hijo. Por todo y más, gracias.

También agradecer a mis hermanas, Inmaculada e Isabel. Sois las mejores hermanas. Sois un tesoro incalculable en mi vida. Sois detallistas, inteligentes, educadas, responsables, unas excelentes profesionales y mejores personas. Tenéis la fantástica habilidad de estar ahí siempre que os he necesitado, apoyándome a lo largo del camino, en momentos de alegría, pero también en los de flaqueza. Muchas gracias por escucharme, apoyarme y darme ánimos.

Gracias también a mis primos, mis sobrinos y mi tía. Cada momento y cada comida familiar que he vivido con vosotros, son momentos inexplicables, porque hay cosas que simplemente se viven, se disfrutan, pero no se explican, y una vida con vosotros como familia es una de esas cosas.

Por último, a ti Marta. Qué decirte que no sepas ya. Cada segundo del día contigo sabe mejor. Te diré gracias por apoyarme en cada una de mis decisiones, hasta el final. Te diré gracias por ayudarme a llegar lejos, por regañarme cuando me lo merezco o en los días menos buenos. Sin darte cuenta, tu sonrisa arregla ese día al instante, le das la vuelta al día, y entonces todo parece que vuelve a merecer la pena. Gracias por recordarme que yo puedo con todo, juntos, así, sin más, consiguiendo hacer fácil lo que parecía difícil. Estás en cada paso que doy, para acompañarme. Y así, poder llegar lejos juntos. A tu lado, siempre más. Te diré gracias por perseguir mis sueños a mi lado, por luchar conmigo en cada batalla y por no dejar que me rinda. Todo es bueno y perfecto cuando estás junto a mí. Ojalá sigas haciendo de tus abrazos el mejor lugar para vivir. Qué suerte andar en la vida, a veces sin saber muy bien a dónde, y poder mirar a mi lado y sonreír, porque me acompaña alguien que de verdad merece la pena.

Gracias a todos vosotros he llegado hasta aquí y lo hago con la seguridad de que no alcanzo ningún objetivo ni se acaba el final de un viaje, sino el comienzo de una de sus etapas. Gracias.

Índice

1. Introducción

1.1	La visión.....	3
1.1.1	Anatomía y fisiología del ojo.....	6
1.1.1.1	Capa externa.....	8
1.1.1.2	Capa intermedia.....	10
1.1.1.3	Capa interna.....	11
1.1.2	Bases fisiológicas y morfológicas de la retina.....	12
1.1.2.1	Capas y tipos celulares de la retina.....	12
1.1.2.1.1	Epitelio Pigmentario Retiniano.....	14
1.1.2.1.2	Capa de los fotorreceptores.....	18
1.1.2.1.3	Membrana limitante externa.....	23
1.1.2.1.4	Capa nuclear externa.....	24
1.1.2.1.5	Capa plexiforme externa.....	24
1.1.2.1.6	Capa nuclear interna.....	24
1.1.2.1.7	Capa plexiforme interna.....	26
1.1.2.1.8	Capa de células ganglionares.....	26
1.1.2.1.9	Capa de fibras nerviosas.....	27
1.1.2.1.10	Membrana limitante interna.....	27
1.1.2.2	Circulación sanguínea de la retina.....	37
1.1.2.3	Barreras retinianas.....	39
1.1.3	Cámaras intraoculares del globo ocular.....	39
1.1.4	Cascada de la fototransducción visual.....	40
1.1.5	Adaptación a la oscuridad.....	42
1.2	Fisiopatología del estrés oxidativo y radicales libres.....	43
1.2.1	Concepto de estrés oxidativo y radicales libres.....	43
1.2.2	Tipos de especies reactivas.....	44
1.2.3	Efecto de los radicales libres.....	46
1.2.4	Sistemas productores de estrés oxidativo.....	47
1.2.5	Sistemas antioxidantes de gran importancia biológica en la retina....	49
1.2.5.1	Sistemas de defensa antioxidantes.....	49
1.2.5.2	Sistemas captadores de ROS o “scavengers”.....	50
1.2.5.2.1	El sistema glutatión.....	50
1.2.5.2.1.1	Metabolismo del glutatión.....	52
1.2.5.2.1.2	Síntesis del glutatión y su regulación....	53
1.2.5.2.2	El sistema tiorredoxina.....	56
1.3	Retinosis pigmentaria. Definición.....	57
1.3.1	Fisiopatología y remodelación de la retina.....	57

1.3.2	Epidemiología.....	60
1.3.3	Genética de la retinosis pigmentaria.....	60
1.3.4	Clínica de la retinosis pigmentaria.....	62
		66
1.3.5.1	Terapia génica.....	66
1.3.5.2	Neurorreparación.....	67
1.3.5.3	Neuroprotección.....	70
1.3.6	Estrés oxidativo y retinosis pigmentaria.....	74
1.3.6.1	Daño oxidativo en la retinosis pigmentaria.....	75
1.3.6.2	Terapias antioxidantes en el tratamiento de la retinosis pigmentaria.....	76
1.3.7	Tiorredoxina y retinosis pigmentaria	78
1.3.8	Factores de crecimiento y retinosis pigmentaria.....	81
1.3.9	Modelos animales en la retinosis pigmentaria.....	82
1.4	Miopía.....	84
1.4.1	Remodelación del globo ocular.....	84
1.4.2	Sintomatología de la miopía.....	86
1.4.3	Epidemiología de la miopía.....	87
1.4.3.1	Según las áreas geográficas.....	88
1.4.4	Factores ambientales y factores genéticos.....	90
1.4.4.1	Factores ambientales.....	90
1.4.4.2	Factores genéticos.....	93
1.4.5	Tipos de miopía.....	94
1.4.6	Tratamiento farmacológico de la miopía.....	96
1.4.7	Estrés oxidativo y miopía.....	98
1.4.8	Óxido nítrico y miopía.....	99
1.4.9	Factores de crecimiento y miopía.....	101
1.4.9.1	Factor de crecimiento endotelial vascular.....	102
1.4.9.1.1	Receptores del factor de crecimiento endotelial vascular.....	103
1.4.9.1.2	El factor de crecimiento endotelial vascular en el ojo.....	104
1.4.9.2	Factor de crecimiento de hepatocitos.....	105

2. Hipótesis

3. Objetivos

4. Material y métodos

4.1	Retinosis pigmentaria.....	117
4.1.1	Tratamiento y manejo de los animales de experimentación.....	117
4.1.1.1	Condiciones de estabulación.....	117
4.1.1.2	Manejo de los animales de experimentación.....	119
4.1.2	Diseño experimental.....	120
4.1.2.1	Tratamiento con tiorredoxina.....	121

4.1.3	Obtención y procesado de las muestras.....	123
4.1.3.1	Estudio histológico y de inmunofluorescencia.....	123
4.1.3.2	Análisis bioquímico.....	124
4.1.3.2.1	Cuantificación por cromatografía líquida de alta eficacia de glutatión oxidado y reducido y de glutamato.....	124
4.1.3.2.2	Análisis de proteínas mediante la técnica de Western blot.....	125
4.1.4	Procedimientos y técnicas experimentales.....	125
4.1.4.1	Estudio histológico y de inmunofluorescencia.....	125
4.1.4.2	TUNEL.....	128
4.1.4.3	Detección por inmunofluorescencia.....	130
4.1.4.4	Análisis bioquímico.....	132
4.1.4.4.1	Análisis de proteínas mediante la técnica de Western blot.....	132
4.1.4.4.1.1	Determinación de proteínas por el método de Bradford.....	132
4.1.4.4.1.2	Técnica de Western blot.....	134
4.1.4.4.2	Determinación de proteínas por el método de Lowry.....	139
4.1.4.4.3	Determinación de las concentraciones de glutamato y de glutatión oxidado y reducido.....	141
4.2	Miopía.....	145
4.2.1	Selección de los pacientes.....	145
4.2.1.1	Criterios de inclusión de los pacientes.....	146
4.2.1.2	Criterios de exclusión de los pacientes.....	146
4.2.2	Diseño del estudio.....	147
4.2.2.1	Obtención de muestras.....	149
4.2.3	Procedimientos y técnicas experimentales.....	149
4.2.3.1	Determinación de los niveles de factores de crecimiento...149	
4.2.3.2	Determinación de los niveles de nitritos en plasma.....	150
4.3	Tratamiento estadístico de los resultados obtenidos.....	151

5. Resultados

5.1	Retinosis pigmentaria.....	157
5.1.1	Estudio histológico con la administración de tiorredoxina.....	157
5.1.1.1	Postnatal 11.....	157
5.1.1.2	Postnatal 17.....	159
5.1.1.3	Postnatal 28.....	161
5.1.2	La tiorredoxina disminuye la muerte celular en la retina de los ratones rd1.....	163
5.1.3	Efecto de la tiorredoxina sobre la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular y del factor de crecimiento de hepatocitos en los ratones rd1 y C3H.....	166
5.1.3.1	Factor de crecimiento endotelial vascular.....	166

5.1.3.2	Factor de crecimiento de hepatocitos.....	168
5.1.4	El tratamiento con tiorredoxina mejora el curso de la gliosis típica en el modelo de ratón rd1.....	170
5.1.4.1	Postnatal 11.....	170
5.1.4.2	Postnatal 17.....	172
5.1.4.3	Postnatal 28.....	174
5.1.5	Activación de la microglía en la degeneración de la retina y su modulación mediante la tiorredoxina.....	176
5.1.5.1	Postnatal 11.....	176
5.1.5.2	Postnatal 17.....	179
5.1.5.3	Postnatal 28.....	182
5.1.6	La tiorredoxina reduce el estrés oxidativo.....	186
5.1.6.1	Concentraciones de glutatión, glutatión reducido y ratio GSH/GSSG.....	186
5.1.6.1.1	Postnatal 11.....	186
5.1.6.1.2	Postnatal 17.....	188
5.1.6.1.3	Postnatal 28.....	190
5.1.6.2	Efecto de la tiorredoxina sobre el glutamato.....	192
5.2	Miopía.....	194
5.2.1	Datos generales de la muestra en estudio.....	194
5.2.2	Agudeza visual.....	196
5.2.3	Longitud axial.....	197
5.2.4	Espesores coróideo y retiniano.....	197
5.2.5	Niveles de factor de crecimiento endotelial vascular en el humor acuoso.....	199
5.2.6	Niveles de factor de crecimiento de hepatocitos en el humor acuoso.....	201
5.2.7	Niveles de nitritos en el humor acuoso.....	203
5.2.8	Relación de las variables con los datos clínicos de la muestra.....	203
5.2.9	Estudio del estrés oxidativo en el humor acuoso.....	207
5.2.9.1	Estudio de la concentración de glutatión en el humor acuoso del ojo de los pacientes.....	207
5.2.9.2	Concentraciones de GSSG.....	208
5.2.9.3	Ratio GSH/GSSG.....	209
5.2.9.4	Concentraciones de glutamato.....	210

6. **Discusión**

6.1	Retinosis pigmentaria.....	213
6.1.1	Estudio de la administración de la tiorredoxina sobre el grosor de la retina.....	215
6.1.2	La tiorredoxina disminuye la muerte celular en la retina de los ratones rd1.....	215
6.1.3	Estudio de la tiorredoxina sobre la expresión en la retina de las proteínas del factor de crecimiento endotelial vascular y del factor de crecimiento de hepatocitos.....	217

6.1.3.1	Factor de crecimiento endotelial vascular.....	217
6.1.3.2	Factor de crecimiento de hepatocitos.....	219
6.1.4	El tratamiento con la tiorredoxina mejora el curso de la gliosis típica en el modelo de ratón rd1.....	220
6.1.5	Activación de la microglía en la degeneración de la retina y su modulación mediante la administración de la tiorredoxina.....	223
6.1.6	La tiorredoxina reduce el estrés oxidativo.....	226
6.1.6.1	Efecto de la tiorredoxina sobre el glutatión oxidado y reducido.....	228
6.1.6.2	Efecto de la tiorredoxina sobre el glutamato.....	230
6.2	Miopía.....	232
6.2.1	Estudio de la expresión de factor de crecimiento endotelial vascular en los pacientes control, bajo miope y alto miope.....	233
6.2.1.1	Causas de la disminución del factor de crecimiento endotelial vascular.....	233
6.2.1.2	Consecuencias de la disminución del factor de crecimiento endotelial vascular.....	235
6.2.2	Estudio de la expresión del factor de crecimiento de hepatocitos en los pacientes control, bajo miope y alto miope.....	236
6.2.2.1	Relación entre los espesores retinianos y los niveles del factor de crecimiento de hepatocitos	
6.2.3	Relación entre el estrés nitrosativo y la miopía.....	239
6.2.4	La miopía aumenta el estrés oxidativo en el humor acuoso.....	240
6.3	Retinosis pigmentaria y miopía.....	242

7. Conclusiones

A Abreviaturas

B Bibliografía

C Anexos

Lista de figuras

Figura 1. Representación gráfica de los grados del campo visual.....	4
Figura 2. A) Vista lateral de los músculos oculares. B) Acción de los músculos oculares externos.....	5
Figura 3. Anatomía de la órbita ocular.....	6
Figura 4. Representación de la estructura del globo ocular, donde se observan las tres capas concéntricas.....	7
Figura 5. Estructura de la córnea.....	9
Figura 6. Esquema representativo de la miosis (A) y la midriasis (B).....	10
Figura 7. Organización neuronal de una retina típica de mamífero. Se presenta una sección transversal de los fotorreceptores, los conos y los bastones, que ilustra las conexiones con el epitelio pigmentario retiniano de manera distal y a las células de transmisión (células bipolares, células horizontales, células amacrinas y células ganglionares) de manera proximal.....	13
Figura 8. Organización de los tres tipos de conos donde se muestra la absorbancia de cada tipo.....	19
Figura 9. Representación de la estructura de los fotorreceptores donde se muestran las principales partes que componen estas células.....	21
Figura 10. A) Migración de los discos que contienen aminoácidos triturados (puntos oscuros) desde el segmento interno hasta el ápice de los bastones. B) Desprendimiento de paquetes de discos de la zona apical y fagocitosis por las células del EPR.....	23
Figura 11. Esquema de los diferentes tipos de células bipolares de la retina.....	25
Figura 12. Dibujo esquemático de los constituyentes celulares de una retina humana.....	29
Figura 13. Activación de la microglía relacionada con la degeneración neuronal. La microglía ramificada se mantiene en modo de espera, en reposo, para regular la homeostasis. Varios desencadenantes de la degeneración de la retina pueden conducir a la activación de la microglía. Las células microgliales ameboides transformadas secretan moléculas de	

bioactivación. La activación crónica puede llevar a respuestas exageradas de la microglía, lo que lleva a daño retiniano y apoptosis neuronal.....35

Figura 14. Esquema que representa la vascularización de la retina a partir de la arteria retinal central a diferentes edades de desarrollo postnatal.....38

Figura 15. Estructura de la rodopsina.....40

Figura 16. Resumen gráfico de los componentes clave de la cascada de transducción visual..41

Figura 17. Enzima superóxido dismutasa, una familia de metaloproteínas que catalizan la reacción de dismutación del radical superóxido a H₂O₂.....49

Figura 18. Estructura química del glutatión.....51

Figura 19. Estructura química de los aminoácidos que conforman la molécula de glutatión...51

Figura 20. Síntesis del glutatión. La síntesis del glutatión se produce a través de un proceso enzimático en dos pasos. El primer paso es catalizado por la γ -glutamilcisteíniligasa. El segundo paso es catalizado por la glutatión sintetasa, que agrega la glicina para formar glutatión.....53

Figura 21. Distribución del glutatión. Una vez sintetizado, el glutatión se distribuye en el retículo endoplásmico, en el núcleo y en las mitocondrias.....54

Figura 22. Representación esquemática de la degeneración progresiva de la vasculatura retiniana asociada a la retinosis pigmentaria.....58

Figura 23. Paisaje observado. A) Sujeto con visión normal. B) Sujeto con retinosis pigmentaria.....64

Figura 24. Diferentes estrategias para tratar la degeneración de la retina.....74

Figura 25. Representación del gen nucleoredoxin-like y sus dos productos.....78

Figura 26. Base anatómica de los errores refractados de la miopía. En la miopía, los rayos de luz paralelos provenientes de los objetos se enfocan frente a la retina, lo que causa visión borrosa en la retina.....85

Figura 27. Gráfico que muestra el número de personas que se estima tienen miopía y alta miopía por cada década desde 2000 hasta 2050.....87

Figura 28. Gráfico que muestra el número de personas que tienen alta miopía por cada 20 años desde 19389
Figura 29. Relación entre el error de refracción y la longitud axial. D = dioptrías.....	95
Figura 30. Muerte de los fotorreceptores durante la retinosis pigmentaria.....	120
Figura 31. Diseño experimental para el tratamiento con tiorredoxina de los ratones rd1 y control.....	122
Figura 32. Representación gráfica de las zonas de contaje para el estudio del número de filas de fotorreceptores.....	127
Figura 33. Fondo de ojo. Instituto de la Retina y Enfermedades Oculares de Valencia.....	148
Figura 34. Tomografía de coherencia óptica.....	148
Figura 35. Reacción de Griess.....	150
Figura 36. Tinción hematoxilina-eosina en las diferentes zonas de la retina de los ratones rd1 y C3H, tratados y no tratados a día postnatal 11.....	158
Figura 37. Tinción hematoxilina-eosina en las diferentes zonas de la retina de los ratones rd1 y C3H, tratados y no tratados a día postnatal 17.....	160
Figura 38. Tinción hematoxilina-eosina en las diferentes zonas de la retina de los ratones rd1 y C3H, tratados y no tratados a día postnatal 28.....	162
Figura 39. Número de células apoptóticas por unidad de área en las diferentes zonas de la retina de los ratones rd1 y C3H, tratados y no tratados a día postnatal 11.....	165
Figura 40. Detección de la proteína del factor de crecimiento endotelial vascular por Western blot en los distintos grupos a los diferentes días de estudio.....	167
Figura 41. Detección de la proteína del factor de crecimiento de hepatocitos por Western blot en los distintos grupos a los diferentes días de estudio.....	169
Figura 42. Inmunofluorescencia para la proteína fibrilar ácida de la glía a día postnatal 11.....	171
Figura 43. Inmunofluorescencia para la proteína fibrilar ácida de la glía a día postnatal 17.....	173
Figura 44. Inmunofluorescencia para la proteína fibrilar ácida de la glía a día postnatal 28.....	175

Figura 45. Imágenes de inmunofluorescencia de las células microgliales totales de la retina de los ratones C3H y rd1 que muestran la morfología de la microglía a día postnatal 11.....	177
Figura 46. Representación gráfica de las células microgliales ramificadas de la retina de los ratones C3H y rd1 a día postnatal 11.....	178
Figura 47. Representación gráfica de las células microgliales redondeadas de la retina de los ratones C3H y rd1 a día postnatal 11.....	179
Figura 48. Imágenes de inmunofluorescencia de las células microgliales totales de la retina de los ratones C3H y rd1 que muestran la morfología de la microglía a día postnatal 17.....	180
Figura 49. Representación gráfica de las células microgliales ramificadas de la retina de ratones C3H y rd1 a día postnatal 17.....	181
Figura 50. Representación gráfica de las células microgliales redondeadas de la retina de ratones C3H y rd1 a día postnatal 17.....	182
Figura 51. Imágenes de inmunofluorescencia de células microgliales totales de la retina de ratones C3H y rd1 que muestran la morfología de la microglía a día postnatal 28.....	183
Figura 52. Representación gráfica de las células microgliales ramificadas de la retina de ratones C3H y rd1 a día postnatal 28.....	184
Figura 53. Representación gráfica de las células microgliales redondeadas de la retina de ratones C3H y rd1 a día postnatal 28.....	185
Figura 54. Concentraciones de glutatión oxidado, glutatión reducido (nmol/mg proteína) y ratio GSH/GSSG en las retinas de los ratones C3H, C3H tratado con tiorredoxina, rd1 y rd1 tratado con tiorredoxina a día postnatal 11 obtenidas por cromatografía líquida de alta eficacia.....	187
Figura 55. Concentraciones de glutatión oxidado (nmol/mg proteína), glutatión reducido (nmol/mg proteína) y ratio GSH/GSSG en las retinas de los ratones C3H, C3H tratado, rd1 y rd1 tratado a día postnatal 17 obtenidas por cromatografía líquida de alta eficacia.....	189
Figura 56. Concentraciones de glutatión oxidado (nmol/mg proteína), glutatión reducido (nmol/mg proteína) y ratio GSH/GSSG en las retinas de los ratones C3H, C3H tratado, rd1 y	

rd1 tratado a día postnatal 28 obtenidas por cromatografía líquida de alta eficacia.....	191
Figura 57. Concentraciones de glutamato (nmol/mg proteína) en la retina de los ratones de los diferentes grupos a día postnatal 11, 17 y 28, obtenidas por cromatografía líquida de alta eficacia.....	193
Figura 58. Representación gráfica de la distribución de la muestra en grupos según la longitud axial.....	194
Figura 59. Representación gráfica de la relación entre la edad y cada grupo de estudio.....	195
Figura 60. Representación gráfica de la relación entre la agudeza visual antes y después de la intervención quirúrgica en cada grupo de estudio.....	196
Figura 61. Representación gráfica de la longitud axial en cada grupo de estudio.....	197
Figura 62. Representación gráfica de la relación entre el espesor coroideo, el espesor retiniano interno y el espesor retiniano normal en cada grupo de estudio.....	198
Figura 63. Representación gráfica de la relación entre los niveles del factor de crecimiento endotelial vascular en el humor acuoso en cada grupo de estudio.....	200
Figura 64. Representación gráfica de la relación entre los niveles del factor de crecimiento de hepatocitos en el humor acuoso en cada grupo de estudio.....	202
Figura 65. Correlación entre los niveles del factor de crecimiento endotelial vascular y la edad de los sujetos.....	203
Figura 66. Correlación entre los niveles del factor de crecimiento endotelial vascular y la edad de los sujetos.....	204
Figura 67. Correlación entre los niveles del factor de crecimiento endotelial vascular y la longitud axial.....	205
Figura 68. Correlación entre los niveles del factor de crecimiento de hepatocitos y la longitud axial.....	205
Figura 69. Correlación entre los niveles del factor de crecimiento de hepatocitos y el espesor coroideo.....	206
Figura 70. Correlación entre los niveles del factor de crecimiento de hepatocitos y el espesor retiniano interno.....	206

Figura 71. Concentraciones de glutatión oxidado en el humor acuoso de los pacientes controles, miopes normales y miopes altos.....	207
Figura 72. Concentraciones de glutatión reducido en humor acuoso de los pacientes controles, bajo miopes y altos miopes.....	208
Figura 73. Ratio de las concentraciones de GSH/GSSG en el humor acuoso de los grupos controles, miopes bajos y altos miopes.....	209

Lista de Tablas

Tabla 1. Lista de anticuerpos empleados para las técnicas de inmunofluorescencia.....	124
Tabla 2. Lista de anticuerpos empleados para la técnica de Western blot.....	130
Tabla 3. Coeficiente Int/Ext según grupo.....	199
Tabla 4. Asociación entre los parámetros bioquímicos y los factores de perfil clínico y anatómico en la muestra completa.....	204
Tabla 5. Valores de glutatión oxidado en los pacientes controles, miopes normales y altos miopes.....	207

1. Introducción

1. Introducción

Los sentidos son el mecanismo fisiológico de la percepción y permiten detectar todo aquello que está a nuestro alrededor. Tradicionalmente, los sentidos especiales se dividen en cinco. Más concretamente, la visión es uno de los sentidos que más se ha desarrollado con la evolución para permitir al organismo adaptarse continuamente a su entorno.

1.1 La visión

El sentido de la visión condiciona enormemente nuestra relación con el medio que nos rodea. La vista es una de las actividades más complejas del organismo en la que intervienen numerosas estructuras (Webvision. The Organization of the Retina and Visual System: <http://webvision.med.utah.edu>).

El sentido de la visión nos permite detectar estímulos luminosos e interpretarlos con el fin de construir una representación del entorno, a través del procesamiento en el córtex cerebral de la información recibida. En el inicio de la vía visual, los impulsos luminosos estimulan los fotorreceptores hiperpolarizando su potencial de membrana, lo que permite que la información se transmita mediante una complicada ruta anatómica a través de las vías ópticas hasta alcanzar la corteza occipital.

Existen especies de mamíferos donde el sentido de la visión es complementario a otros más utilizados. Sin embargo, en el ser humano, la visión es de suma trascendencia, ya que la degeneración de sus estructuras conlleva un deterioro importante de la calidad de vida de los individuos.

Un ojo humano en el plano horizontal y mirando al frente, abarca 150° aproximadamente, 90° temporales y 60° nasales. En visión binocular, se amplía el campo visual percibido a unos 180°, ya que el campo del ojo derecho e izquierdo se solapan en parte (Figura 1).

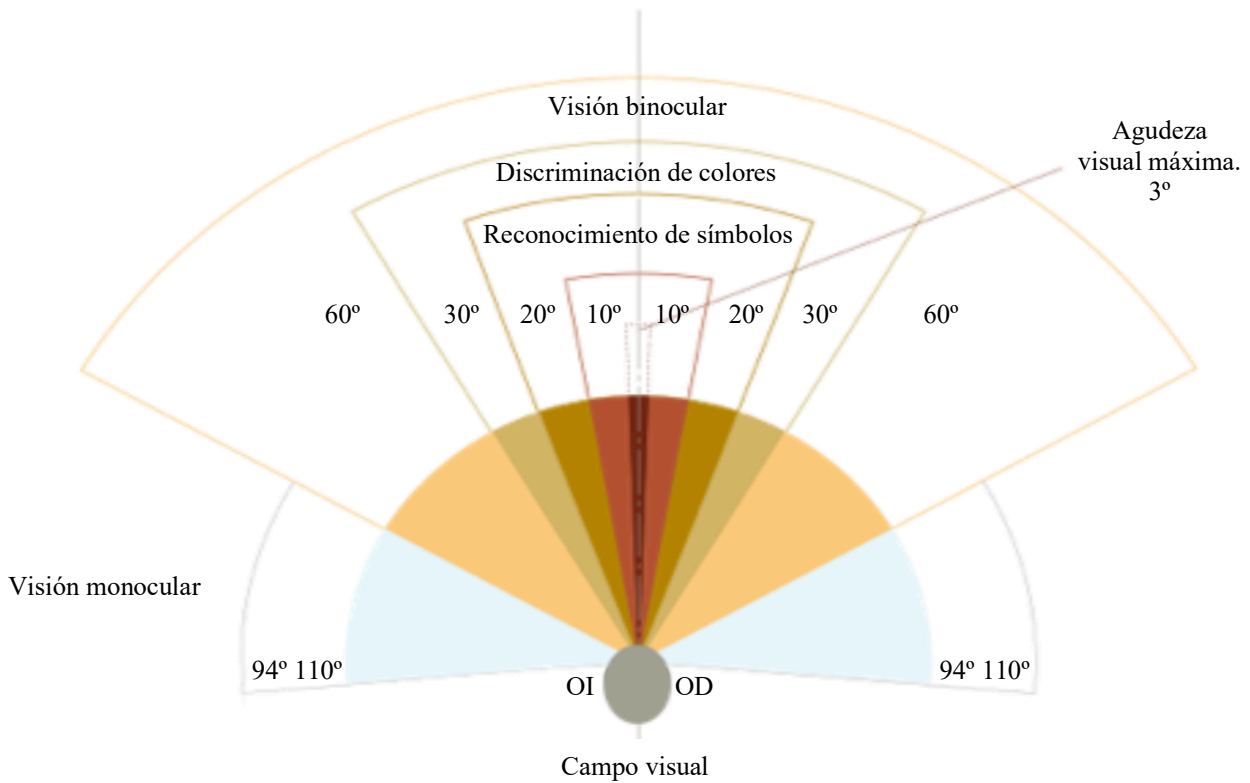


Figura 1. Representación gráfica de los grados del campo visual. Adaptado de Jay, 1981.

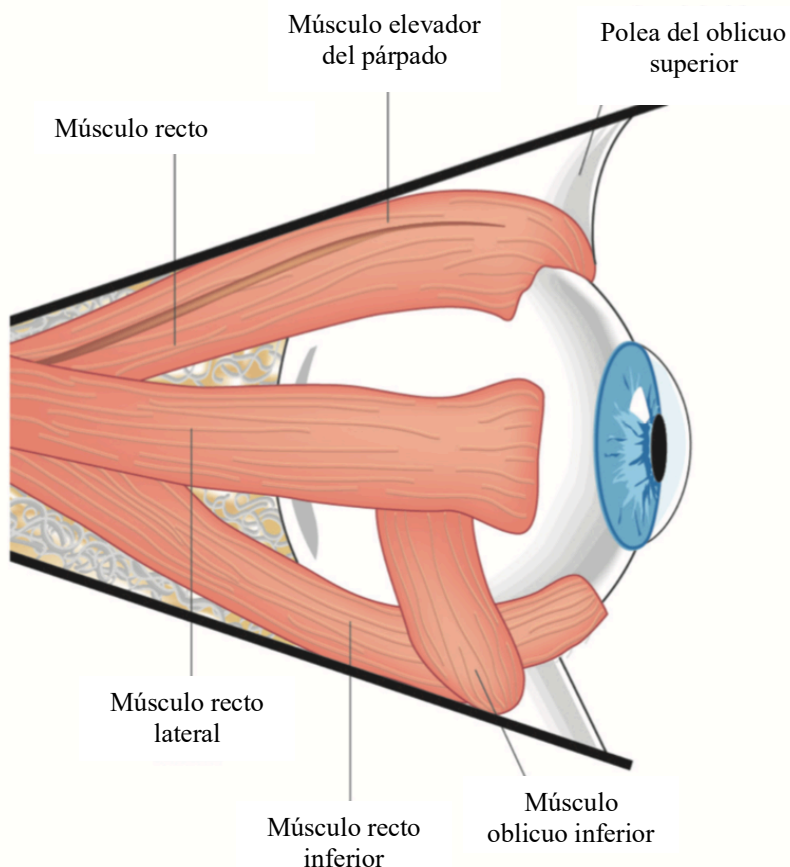
Para obtener una buena binocularidad es necesario:

- Una correcta coordinación y sincronización motora que permita que ambos ojos se dirijan simultáneamente hacia el objeto fijado.
- Una coordinación sensorial binocular.
- Una adecuada integridad anatómica y dióptrica en ambos ojos.

El grado máximo de la función visual es la visión estereoscópica o tridimensional. La estereopsis surge de la interpretación que hace el cerebro cuando, a partir de las diferencias mínimas existentes entre dos imágenes de un mismo objeto proyectadas en la retina de cada ojo (disparidad horizontal o disparidad retiniana), es capaz de recomponer una imagen tridimensional.

El ojo está rodeado de seis músculos extraoculares, cuatro músculos rectos (superior, inferior, medio y lateral) y dos músculos oblicuos (superior e inferior). Estos músculos trabajan de forma sinérgica en ambos ojos para conseguir una imagen única y para que se produzca la visión en profundidad o estereoscópica (Figura 2).

A)



B)

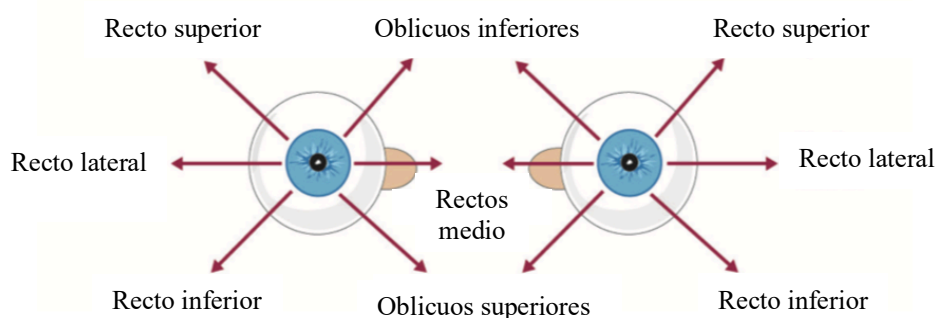


Figura 2. A) Vista lateral de los músculos oculares. B) Acción de los músculos oculares externos.

Adaptado de Findlay, 2009.

Los cuatro músculos rectos y el músculo oblicuo superior nacen de un anillo tendinoso (anillo de Zinn), situado en la parte posterior de la órbita ocular. Los seis músculos se insertan en la esclerótica.

1.1.1 Anatomía y fisiología del ojo

El ojo o globo ocular es una estructura esferoidal (abombado ligeramente en su parte anterior) que tiene un diámetro de aproximadamente 2,5 centímetros de diámetro y se aloja en su correspondiente órbita ocular o cavidad orbitaria, situada en la parte superior de la cara.

De este modo, los globos oculares se encuentran protegidos por una cavidad ósea excepto en su polo anterior (Miller, 1989). La órbita ocular posee unos orificios adicionales para posibilitar el paso de los vasos sanguíneos y de los nervios que nutren y controlan las estructuras intraorbitarias. La órbita ocular está rellena de una capa gruesa de tejido adiposo (llamada comúnmente grasa orbitaria) que se encuentra a su alrededor y sirve para mantener al globo ocular en su posición y amortiguar así los movimientos y posibles golpes que pueda recibir.

Por encima de la órbita ocular se sitúa el lóbulo frontal del cerebro; por la cara nasal y posterior, el lagrimal, el etmoides y el esfenoides y por la parte externa el hueso cigomático o malar (Figura 3).

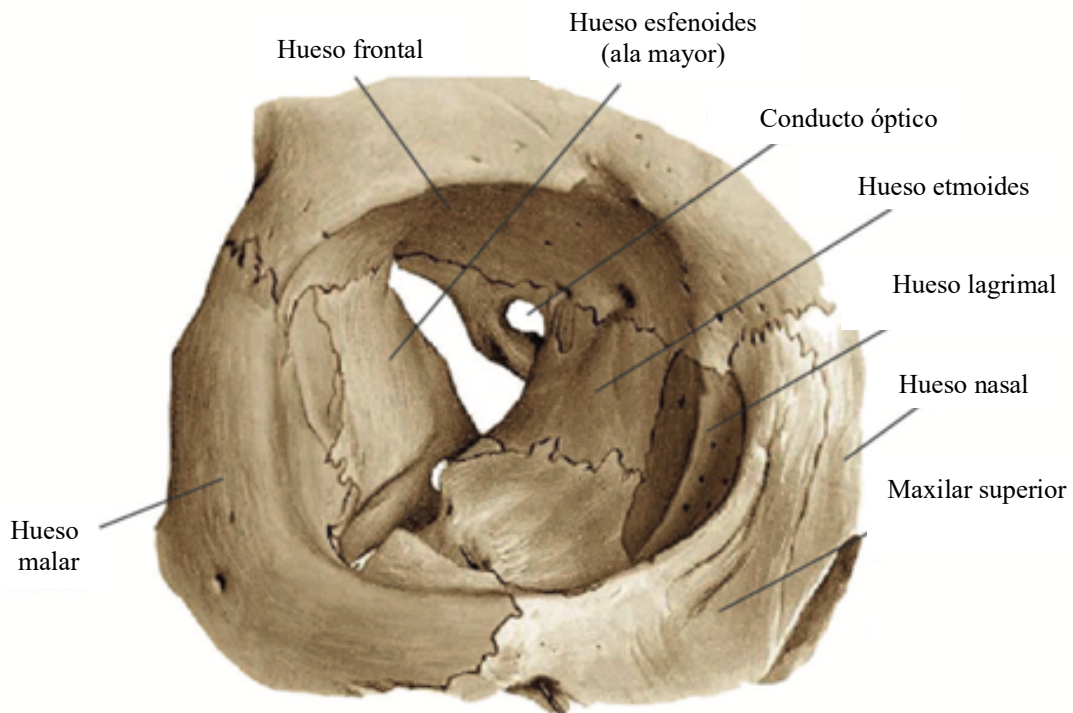


Figura 3. Anatomía de la órbita ocular. Adaptado de McClung et al., 2006.

El ojo se divide en dos segmentos: segmentos anterior y posterior. El segmento anterior está formado por la córnea, el cristalino, el iris y el cuerpo ciliar; y el segmento posterior está formado principalmente por el vítreo, la retina y la coroides (Graw, 2010).

Anatómicamente, el globo ocular está constituido por tres túnicas o capas concéntricas (Figura 4):

- Capa externa, denominada cubierta, formada por la esclera y la córnea.
- Capa intermedia, llamada úvea o tracto uveal. Está formada por el cuerpo ciliar y el iris en su parte anterior y la coroides en su parte posterior.
- Capa interna, llamada retina.

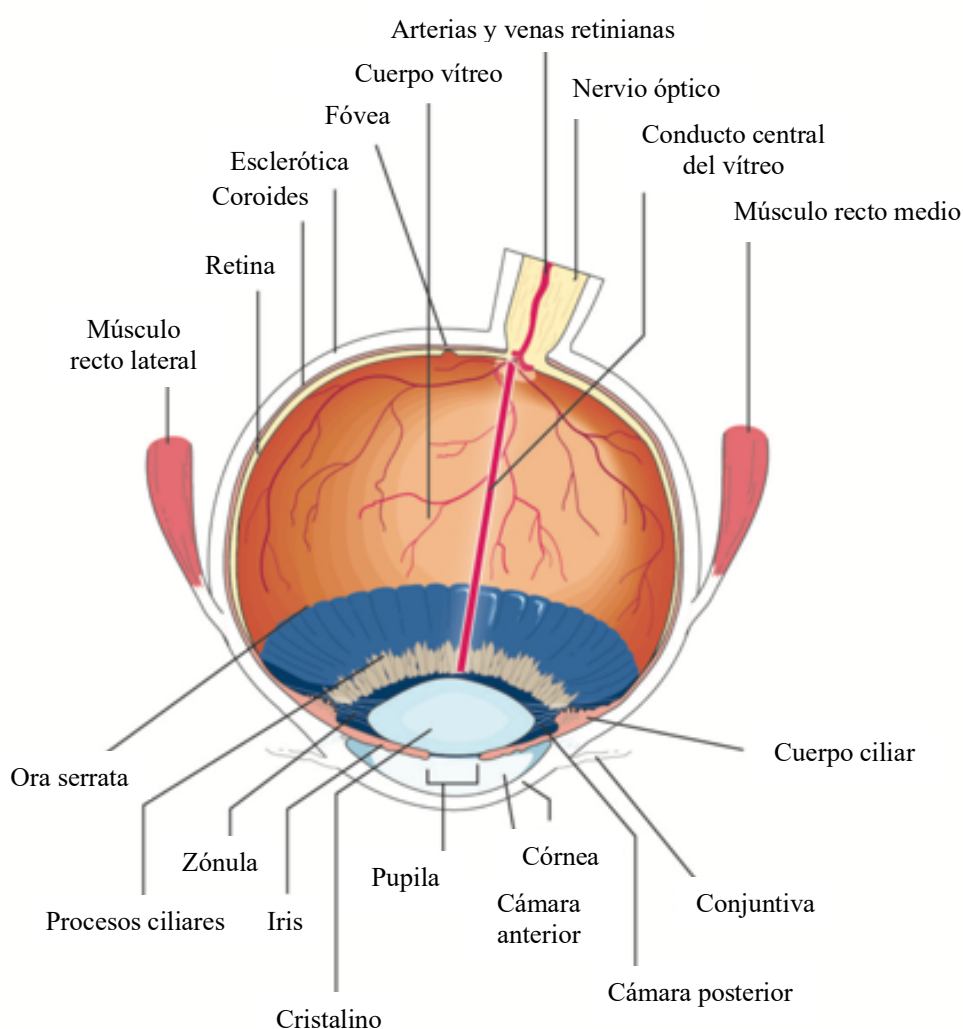


Figura 4. Representación de la estructura del globo ocular, donde se observan las tres capas concéntricas. Adaptado de Riordan-Eva P, Cunningham ET, Vaughan y Asbury Oftalmología general. 18ª Edición. McGraw-Hill, Madrid 2012.

1.1.1.1 Capa externa

En la capa externa se distingue:

- **La esclera.** Es una capa densa y elástica cuya función principal es dar forma al globo ocular y contribuir a mantener la presión intraocular. Es de color blanco debido al gran contenido en agua y a la disposición irregular de sus fibras. En su estructura se distinguen tres capas de fuera a dentro (Watson and Young, 2004):
 - La lámina epiescleral, también conocida como epiesclerótica.
 - El estroma escleral, avascular y sin inervación.
 - La lámina fusca, que tiene esa denominación debido a su ligera coloración oscura, debido a la presencia de melanocitos.

- **La córnea.** Es una membrana avascular transparente que está integrada por fibras de colágeno espaciadas unas de otras de una manera equidistante, característica que determina su transparencia (DelMonte and Kim, 2011). Tiene un espesor medio de 550 μm . Junto con la película lagrimal, la córnea proporciona la superficie con mayor poder refractivo del ojo, contribuyendo a 2/3 del poder refractivo del globo ocular (Sridhar, 2018). La superficie posterior de la córnea está bañada por el humor acuoso, del cual se nutre por medio de los conductos linfáticos. En la córnea se distinguen cinco capas bien diferenciadas, tal y como muestra la figura 5 (Li et al., 1997):
 - El epitelio, formado por una serie de filas de células estratificadas.
 - La membrana de Bowman, que tiene la función de unir el epitelio corneal al estroma.
 - El estroma, que constituye la mayor porción del espesor corneal (90%) y está formado por fibras de colágeno regularmente ordenadas.
 - La membrana de Descemet, una membrana elástica que mide 7 μm de grosor y está compuesta de colágeno.

- El endotelio, una monocapa de tan sólo 5 μm de grosor formada por células hexagonales metabólicamente activas y que forma la capa más interna de la córnea en contacto con el humor acuoso. A diferencia del epitelio, su capacidad de regeneración es prácticamente nula.

La zona de transición entre la córnea y el resto de la esclera se denomina limbo esclerocorneal, y a este nivel se encuentran, en profundidad, las estructuras anatómicas responsables del drenaje del humor acuoso.

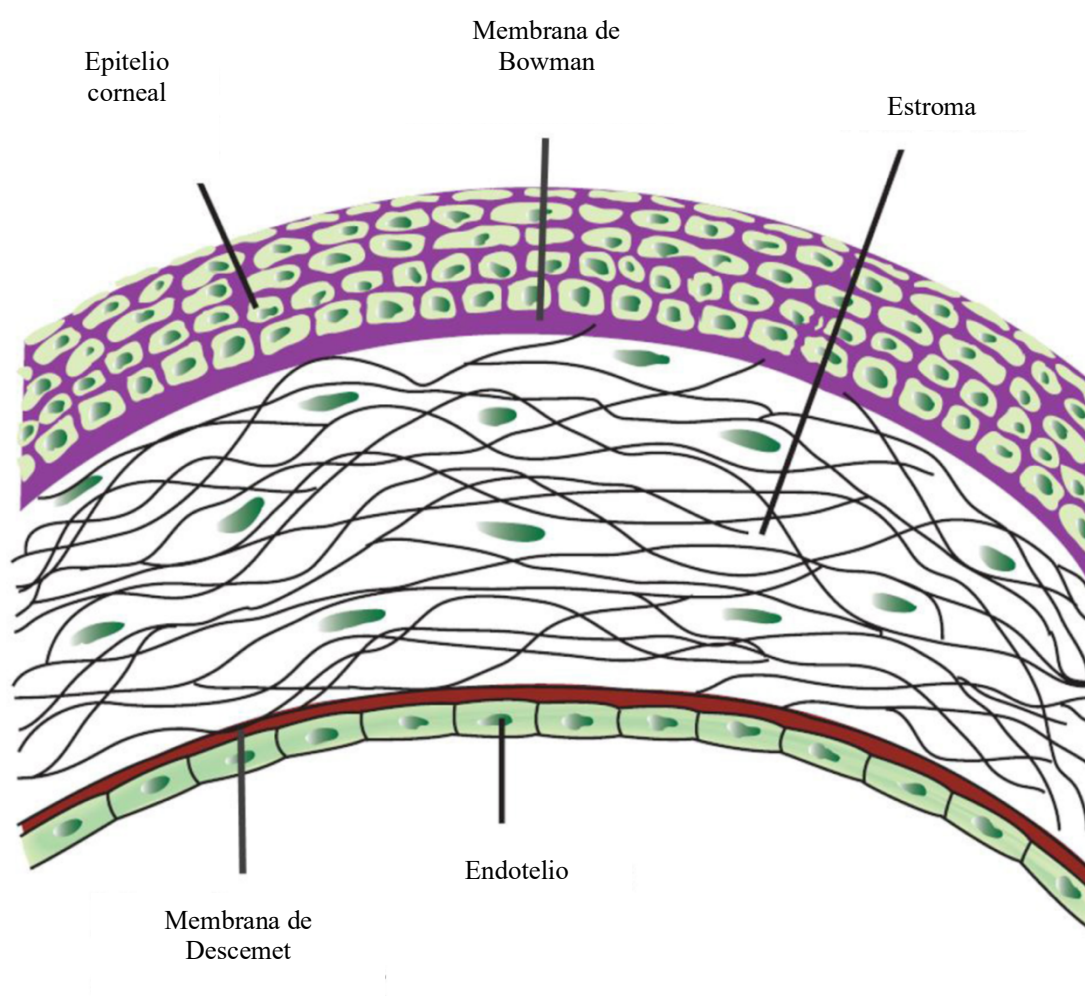


Figura 5. Estructura de la córnea. Adaptado de Doghty and Zaman, 2000.

1.1.1.2 Capa intermedia

La capa intermedia, llamada úvea o tracto uveal es la capa nutritiva del ojo situada entre la esclera y la retina.

La úvea se divide en tres partes diferenciadas (de la parte anterior a la parte posterior):

- **El iris** es un diafragma circular pigmentado que está compuesto por dos músculos (músculo dilatador y esfínter pupilar) que regulan la luz que se introduce en el ojo. Está constituido por tejido conectivo recubierto por un epitelio pigmentado. Posee un orificio central, la pupila, la encargada de regular la entrada de luz en el ojo (figura 6), y está unido al cuerpo ciliar en la periferia por tejido conjuntivo.
- **El cuerpo ciliar** está situado entre el iris y la coroides y está formado por los procesos ciliares y el músculo ciliar. Los procesos ciliares producen el humor acuoso que nutre el cristalino, una lente biconvexa situada detrás del iris, clave en la función óptica del ojo. El músculo ciliar es el encargado de regular la curvatura del cristalino. Ambos están unidos mediante fibras de colágeno (zónula de Zinn) que tiran del cristalino y mantienen tensa la cápsula. La contracción del músculo ciliar hace que se relaje la zónula y se abombe el cristalino gracias a la elasticidad de la cápsula anterior, aumentando su poder refractivo y permitiendo que se lleve a cabo la acomodación visual. La transparencia del cristalino se mantiene gracias a la ausencia de vasos, la distribución de sus fibras y el poco metabolismo anaerobio.

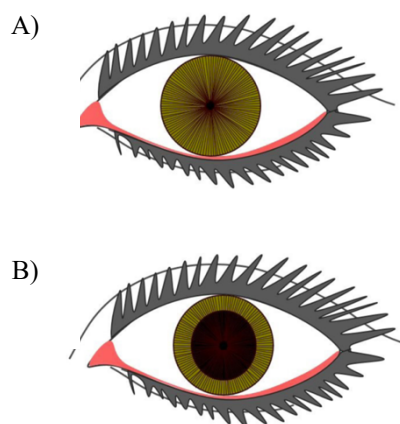


Figura 6. Esquema representativo de la miosis (A) y la midriasis (B). Adaptado de Maddock et al., 1981.

- **La coroides** es una estructura fundamentalmente vascular, rica en vasos, muy fina (de tan sólo 0,2 μm) y muy pigmentada, lo que impide que penetre la luz (Delaey and Van De Voorde, 2000). Es este grado de pigmentación lo que determina la coloración del fondo del ojo, pues la retina es transparente. Esta capa de la úvea es la responsable de aportar nutrientes a las estructuras adyacentes, entre ellas la capa interna. La coroides se encarga del suministro del 65-75% del oxígeno y de la glucosa que consume el tejido retiniano. Histológicamente, la coroides se divide en tres capas:
 - La supracoroides o lámina supracoroidea, es una zona de tejido conjuntivo que comprende la zona de transición entre la esclera y la capa de grandes vasos sanguíneos. Mide entre 10 y 34 μm de grosor.
 - La capa vascular constituye la mayor parte de la coroides. Anatómicamente, está constituida por numerosos vasos sanguíneos que van haciéndose más pequeños, lo que permite subdividir esta capa en tres porciones según el tamaño vascular:
 - Capa de Haller (capa externa de grandes vasos sanguíneos).
 - Capa de Sattler (capa intermedia de vasos de mediano calibre)
 - Coriocapilar, compuesta por una monocapa de capilares derivados de la capa de vasos sanguíneos de la capa de Sattler que garantiza la nutrición del tercio externo de la retina.
 - La membrana de Bruch, la capa más interna de la coroides y que constituye una barrera intermedia entre la capa coriocapilar y el epitelio pigmentario retiniano.

1.1.1.3 Capa interna

La capa más interna de las tres tunicas concéntricas que conforman la pared del globo ocular y probablemente la más importante respecto a la función visual es la retina, la capa sensorial neural (Malhotra et al., 2011). Es parte del Sistema Nervioso Central (SNC) y, como otras partes del SNC, deriva del tubo neural, en concreto del neuroectodermo.

La retina es una fina membrana que cubre parte de la superficie interna del ojo (Dalke and Graw, 2005). En ella se inicia la visión y es la parte especializada del sistema nervioso destinada a recoger y transmitir las sensaciones visuales. Por delante, está integrada en el cuerpo ciliar a través de la ora serrata. En su parte central y posterior, se distinguen la mácula y la papila del nervio óptico, punto ciego de la retina, ya que carece de fotorreceptores, y es donde los axones de las células ganglionares abandonan la retina para formar el nervio óptico.

1.1.2 Bases fisiológicas y morfológicas de la retina

La retina tiene una estructura muy compleja y consta histológicamente de diez capas, las cuales pueden dividirse funcionalmente en dos partes: la parte interna o la retina neurosensorial (nueve capas), que comprende la capa fotosensible de los fotorreceptores, los conos y los bastones, y sus conexiones nerviosas, que captan la luz y la convierten en impulsos nerviosos eléctricos, los cuales son transmitidos mediante el nervio óptico; y la parte externa, que incluye el Epitelio Pigmentario Retiniano (EPR), que permite los cambios bioquímicos necesarios por el estímulo de los receptores luminosos.

1.1.2.1 Capas y tipos celulares de la retina

Desde el punto de vista histológico, se distinguen en la estructura de la retina varios tipos de células diferentes: células fotorreceptoras (conos y bastones), células horizontales, células bipolares, células amacrinas, células ganglionares, células de la glía y células plexiformes.

Las diez capas de la retina, desde la más externa (en contacto con la coroides) hasta la más interna (en contacto con el humor vítreo) son (figura 7):

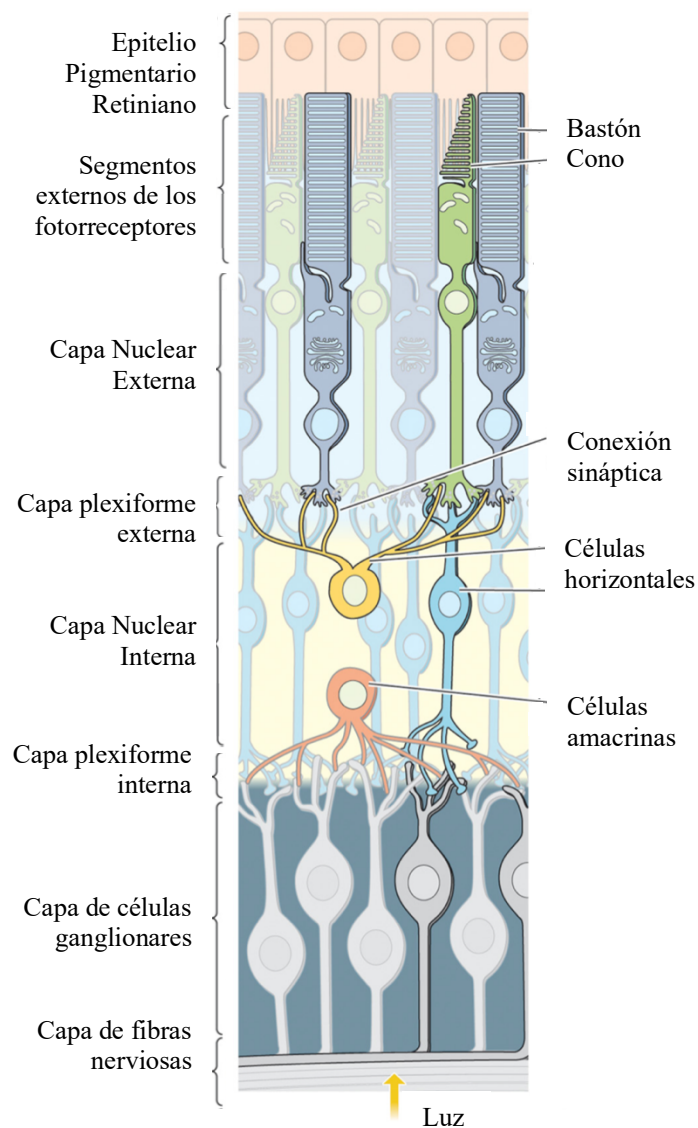


Figura 7. Organización neuronal de una retina típica de mamífero. Se presenta una sección transversal de los fotorreceptores, los conos y los bastones, que ilustra las conexiones con el epitelio pigmentario retiniano de manera distal y a las células de transmisión (células bipolares, células horizontales, células amacrinas y células ganglionares) de manera proximal. Adaptado de Palczewski 2012.

1.1.2.1.1 Epitelio pigmentario retiniano

El EPR es la capa más externa de la retina. En realidad, es una monocapa de células epiteliales pigmentadas adyacente a los segmentos externos de los fotorreceptores que se encarga de su aporte sanguíneo desde la coroides (Rizzolo, 1997).

Se estima que el EPR de cada ojo tiene aproximadamente 4 millones de células cuboidales de morfología hexagonal. Entre el EPR y los fotorreceptores, existe un espacio virtual llamado espacio subretiniano, relleno por una matriz de proteínas y proteoglicanos.

Las células del EPR están unidas entre sí de manera muy estrecha mediante complejos de unión, formando parte, junto con la membrana de Bruch, de la barrera hematorretinina externa (Spitznas, 1974; Nag and Wadhwa, 2012). De esta manera, su superficie basal descansa sobre la membrana de Bruch y su superficie apical está íntimamente relacionada con la capa de los fotorreceptores.

En la parte basal celular se encuentran las mitocondrias y los núcleos celulares, mientras que en el citoplasma apical se encuentran los gránulos fusiformes de pigmento (melanina), que además de aportar al epitelio el característico color macroscópico negro, protegen a las células del daño causado por el estrés oxidativo (Peters and Schraermeyer, 2001).

Por todo ello, el EPR es necesario para la supervivencia de los fotorreceptores, ya que, si éste se destruye, los fotorreceptores acabarán degenerando con el tiempo (Korte et al., 1994; Del Priore et al., 1996).

El metabolismo sano del EPR es esencial para la supervivencia de los fotorreceptores y para la visión.

Las funciones principales del epitelio pigmentario retiniano son:

- **Renovación diaria y fagocitosis de los discos más antiguos de los segmentos externos de los fotorreceptores** (Young and Bok, 1969; Finnemann, 2003). Los segmentos externos de los bastones sufren una renovación continua, añadiéndose una nueva membrana en la base de los segmentos externos y retirándose la membrana vieja hacia los extremos externos de los mismos para ser fagocitada por el EPR. Actualmente, los restos de los discos de los bastones que han sido engullidos por el EPR se llaman fagosomas (Finnemann et al., 1997). La carga fagocítica masiva que sufren estas células a lo largo de la vida hace que se acumulen en ellas granos de lipofucsina, que serán los productos residuales derivados del metabolismo en los fagosomas que digieren los discos en el epitelio pigmentario.
- **Estabilizador de radicales libres.** La melanina del EPR puede funcionar como un estabilizador de radicales libres al aceptar electrones producidos por la fotoactividad de los segmentos externos de los conos y los bastones de la retina. La retina es el único tejido neuronal que está expuesto directa y frecuentemente a la luz, lo cual favorece la oxidación de los lípidos que se vuelven extremadamente tóxicos para las células de la retina (Girotti and Kriska, 2004). Además, la retina es un tejido que consume mucho oxígeno, lo que genera una alta producción de especies reactivas del oxígeno (ROS, de las siglas en inglés *Reactive Species Oxygen*). De ese modo, los radicales libres generados por la irradiación de luz en los fotorreceptores son capturados por los gránulos de melanina, protegiendo de esta forma a los fotorreceptores del entorno fotooxidativo (Sarna, 1992; Cuenca et al., 2014). El EPR tiene que ser capaz de mantener la integridad estructural de la retina a partir de una defensa eficiente contra los radicales libres y la exposición a la fotooxidación (Beatty et al., 2000).

- **Absorción y filtrado de la energía de la luz.** El EPR interviene en la absorción de la radiación lumínica dispersa gracias a la melanina (Boulton and Dayhaw-Barker, 2001). Este pigmento negro, que actúa como una pantalla solar, provoca la disminución de la reflexión interna y disipa el calor, convirtiendo la luz en energía térmica, la cual puede ser transportada de forma eficiente por la coroides. Además, absorbe, limita e impide la cantidad de luz que se refleja o se dispersa sobre todo el globo ocular, evitando de esa manera la iluminación difusa de la retina y protegiendo así a los fotorreceptores. La luz que puede llegar a absorber tiene una longitud de onda que oscila entre los 400 y los 800 nm.
- **Provisión de la barrera hematorretiniana.** El EPR es el principal componente de la barrera hematorretiniana (BHR), que se sitúa entre la circulación coroidea y la retina (Raymond and Jackson, 1995), por lo que es esencial para la integridad de la retina (Strauss, 2005).
- **Transporte activo de metabolitos.** El EPR realiza el transporte de iones y otros metabolitos finales entre la coroides y la retina (Dornonville de la Cour, 1993; Hamann et al., 2000). El EPR transporta iones y productos metabólicos finales del espacio subretiniano hacia la sangre y, de forma inversa, toma nutrientes tales como la glucosa, el retinol y los ácidos grasos de la sangre y los entrega a los fotorreceptores. Todo ello lo lleva a cabo a través de la distribución específica de múltiples bombas, canales y transportadores, ya sea de su lado apical o basolateral. La bomba Na^+/K^+ ATPasa que se encuentra en la membrana apical del EPR proporciona la energía necesaria para este transporte transepitelial (Gundersen et al., 1991; Marmorstein, 2001). Ya que la retina es avascular y la capa de los capilares coroides es la fuente principal de oxígeno y nutrientes para ésta, el EPR se encarga de controlar el intercambio de nutrientes y metabolitos solubles en agua entre la coriocapilar y el espacio subretiniano.

- **Transporte de agua.** Debido principalmente al gran consumo metabólico de los fotorreceptores y a la Presión Intraocular (PIO) del humor vítreo (Marmor, 1999), existe una gran cantidad de agua en la retina. Esto conduce a la necesidad de eliminar constantemente esta agua hacia los capilares de la coroides (Marmor, 1990) llevada a cabo en dos pasos: las células de Müller son las encargadas de transportar el agua por el interior de la retina (Moseley et al., 1984; Nagelhus et al., 1999) y ya en el espacio subretiniano, es eliminada por el EPR. Además, de esa manera, el EPR actúa contribuyendo a la adhesión retiniana normal creando una presión negativa entre ambas capas y evitando que se produzca su separación (Bird and Marshall, 1986; Steinberg, 1986).

- **Almacenamiento y transporte de la vitamina A o retinol durante el ciclo visual** (Dowling, 1960), ya que está constantemente transportándolo desde los fotorreceptores al EPR, donde se re-isomeriza a 11 cis-retinal y es reciclado y transportado de vuelta a los fotorreceptores para la reconstrucción de los segmentos externos sensibles a la luz.

- **El EPR es capaz de segregar una serie de factores inmunosupresores que ayudan a mantener la integridad estructural de la retina y la coroides** (Witmer et al., 2003), jugando un papel importante manteniendo el privilegio inmunológico del ojo (Ishida et al., 2003).

- **Eliminación de los metabolitos tóxicos producidos por los fotorreceptores** (Hamann, 2002). El EPR es responsable de la eliminación, entre otros, del ácido láctico producido por los segmentos externos de los bastones (Kenyon et al., 1994; Zeuthen et al., 1996).

- El EPR **secreta factores de crecimiento** (Tanihara et al., 1997) esenciales para el mantenimiento de la integridad de la retina (Steele et al., 1993; Cao et al., 1999), y garantizan una estructura básica para un correcto suministro de los nutrientes. Por ejemplo, el EPR puede segregar factores de crecimiento de fibroblastos (FGF-1, FGF-2 y FGF-5, de las siglas en inglés *Fibroblast Growth Factor*) (Sternfeld et al., 1989; Khaliq et al., 1995; Walsh et al., 2001), factor de crecimiento transformante (TGF) (Kvanta, 1994; Matsumoto et al., 1994), factor de crecimiento insulínico (IGF-I) (Martin et al., 1992), factor neurotrófico ciliar (CNTF) (Cao et al., 1997), factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) (Campochiaro et al., 1989; Campochiaro et al., 1994), VEGF (del inglés *Vascular Endothelial Growth Factor*) (Lu et al., 1998; Wirostko et al., 2008) y el factor derivado del epitelio pigmentario (PEDF, de las siglas en inglés *Pigment Epithelium-Derived Factor*) (Dawson et al., 1999; Ogata et al., 2001; Ogata et al., 2002).

1.1.2.1.2 Capa de los fotorreceptores

La percepción visual comienza cuando se activan los elementos fotosensibles de los fotorreceptores (Pickard and Sollars, 2012). Los conos y los bastones son las células nerviosas más abundantes de la retina cuya función es la fototransducción. Es decir, son células especializadas en convertir la luz en una señal nerviosa mediante las cromoproteínas (rodopsina) que, al modificarse con la luz, conducen a cambios de potencial de la membrana plasmática. Se diferencian dos tipos de fotorreceptores: los conos y los bastones.

Los 5 millones de conos están concentrados en la región central de la mácula, la fovea (van Soest et al., 1999), y son los mediadores de la visión diurna o fotópica, la percepción del color. Los conos, responsables de la percepción cromática, deben abarcar todo el espectro visible (380-780 nm) (figura 8) y por todo ello, existen tres clases de conos, dependiendo del tipo de opsina que expresen.

Este fotopigmento se puede dividir en tres subtipos de pigmentos sensibles (Marc and Sperling, 1977; Yokoyama, 2000), tal y como refleja la figura 8:

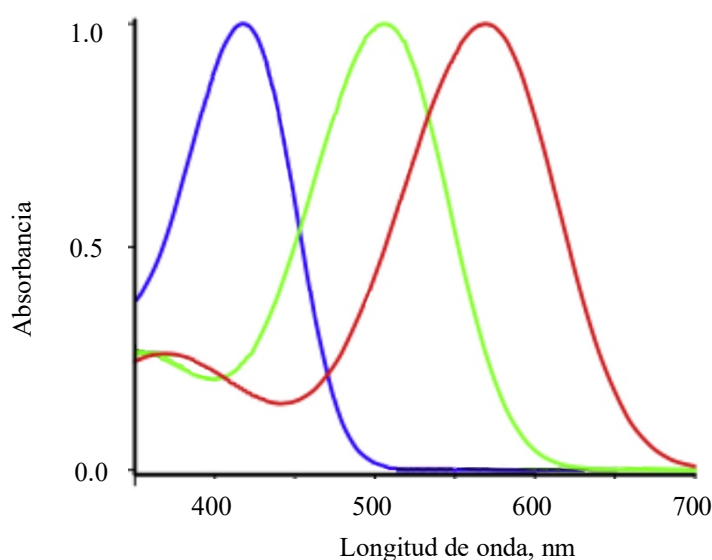


Figura 8. Organización de los tres tipos de conos donde se muestra la absorbancia de cada tipo. Adaptado de Bowmaker, 2008.

- **Los conos azules**, que responden a una longitud de onda de 450 nm y son sensibles a longitudes de onda cortas y se conoce como opsina S, cianopsina (del inglés *short wavelength*).
- **Los conos verdes**, sensibles a la luz de longitud de onda media, opsina M, cloropsina (*medium wavelength*) (luz verde, 530 nm).
- **Los conos rojos**, sensibles a la luz de longitud de onda larga (565 nm) y se conoce como opsina L, eritropsina (*long wavelength*).

La existencia de tres tipos de conos, y la diferencia en la sensibilidad a las diferentes longitudes de onda de cada uno de ellos, es la responsable de la visión tricromática típica de los humanos. Sin embargo, numerosas especies de mamíferos, como los roedores, presentan visión dicromática ya que cuentan solamente con dos tipos de conos: los conos S (Bowmaker and Hunt, 2006) y los conos M, azules y verdes respectivamente (Jacobs et al., 2001). Por este motivo, los roedores no son sensibles a longitudes de onda largas que los humanos sí somos capaces de percibir, como la luz roja (Szél et al., 1993; Applebury et al., 2000).

Por otro lado, los bastones son muy abundantes y representan el 95% de todos los fotorreceptores en los humanos (Curcio et al., 1990). Tienen una longitud de 24 μm y existen 100 millones en la retina humana, excluidos de la zona central y distribuidos en la periferia (Tang et al., 2013). Los bastones son las células que responden a estímulos de luz en condiciones de baja iluminación y se encargan de la visión escotópica. Todos los bastones tienen el mismo pigmento, la rodopsina, y su sensibilidad se fija a unas longitudes de onda cercanas a 500 nm. Normalmente, son los primeros fotorreceptores afectados en la RP.

Aunque morfológicamente varían entre ambos, la estructura funcional de los conos y los bastones es semejante.

Los fotorreceptores están formados por (figura 9):

- **Segmento externo**, es la parte fotosensible de la célula que se encuentra en íntimo contacto con el EPR. Está formado por microvesículas que dan lugar a discos apilados rodeados de membrana plasmática, en cuyo interior se encuentran los pigmentos sensibles a la luz.
- **Cilio conector**, estructura que conecta los segmentos externo e interno, y a través del cual viajan moléculas necesarias para la constante renovación de los discos, y, por lo tanto, para el correcto funcionamiento de la retina (Eley et al., 2005).
- **Segmento interno**, que sintetiza los componentes metabólicos para la renovación de los segmentos externos de los fotorreceptores (Kolb, 2003). Se subdivide en:
 - Elipsoide, parte más externa del segmento interno. Está lleno de mitocondrias que proporcionan la energía requerida para el funcionamiento de los fotorreceptores y los procesos de traducción del segmento externo.
 - Mioide, parte más interna del segmento interno, rico en glucógeno y ribosomas. Es el encargado de la síntesis y elaboración de membranas y cuerpos celulares y del transporte de las sustancias al segmento externo.

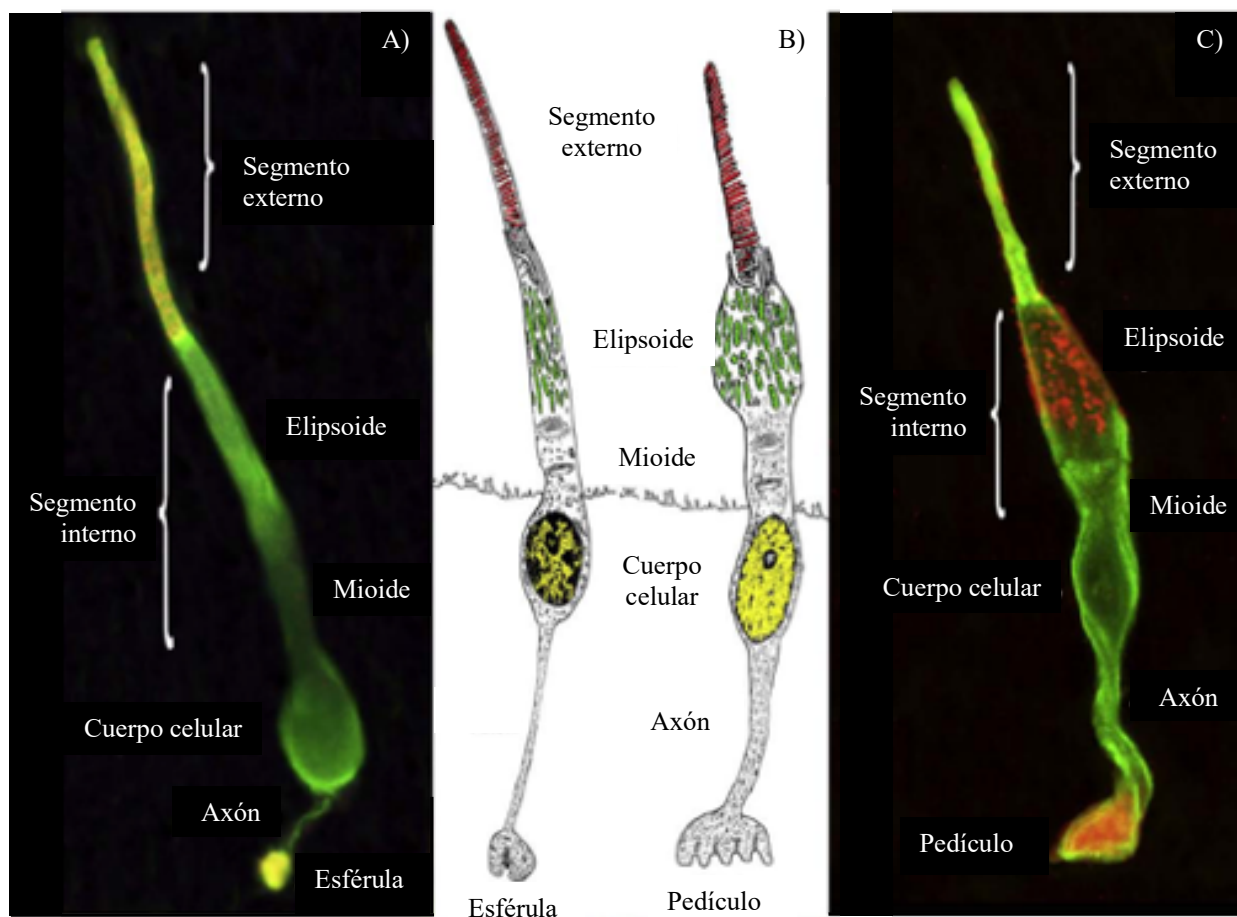


Figura 9. Representación de la estructura de los fotorreceptores donde se muestran las principales partes que componen estas células. A) y C). Imágenes con microscopio de con focal. B). Dibujos esquemáticos de la estructura de un bastón (izquierda) y de un cono (derecha) que muestran las partes principales de los fotorreceptores. Adaptado de Cuenca et al., 2014.

- **Cuerpo o soma celular**, que contiene el núcleo de los fotorreceptores, siendo éste mayor en los conos.
- **Terminaciones o región sinápticas**, que se hallan en la Capa Plexiforme Externa (CPE). Ambas células contienen en la superficie de la región sináptica conexiones invaginadas con componentes de neuronas intermediarias profundas. En los bastones, se denomina esférula porque tiene forma redondeada, mientras que en los conos tiene una morfología cónica y se llama pedículo.

Los fotorreceptores están expuestos a niveles constantes de luz, conduciendo a la acumulación de proteínas y lípidos. Cada día, la concentración de sustancias fotooxidadas aumenta dentro de los fotorreceptores. Por tanto, para mantener la excitabilidad de los fotorreceptores, los segmentos externos de los bastones son sometidos a una renovación constante al reconstruirse nuevamente a partir de su base.

Las extremidades desprendidas de los segmentos externos son fagocitadas por el EPR, el cual los digiere y entrega de vuelta a los fotorreceptores las moléculas esenciales, como el ácido docosahexaenoico y el retinol, para reconstruir sus segmentos externos sensibles a la luz (Bok, 1993). El reemplazo de la membrana para la renovación de los discos comienza con la síntesis de nuevas membranas en la región mioide del segmento interno. En poco tiempo, las proteínas sintetizadas son transportadas hasta la base del segmento externo, donde se forman los discos de doble membrana característicos y se van eliminando los discos viejos, que se van desprendiendo para ser posteriormente fagocitados por el EPR (Young, 1967; Bok, 1985).

En los bastones, los discos que contienen las moléculas de fotopigmento se sintetizan en el segmento interno y se desplazan hacia el EPR. A medida que se añaden nuevos discos, éstos pierden su continuidad con la membrana celular. Cada disco tiene una vida media de 10 días aproximadamente desde que son sintetizados en el segmento interno, alcanzan el segmento externo y son fagocitados por el EPR dando lugar a los fagosomas (figura 10). De media, cada célula del EPR fagocita de 2000 a 4000 discos en una semana (Young, 1971). Este proceso de fagocitosis de los segmentos externos tiene lugar durante el día, ya que se activa por la luz (LaVail, 1983).

Se han identificado tres receptores involucrados en la regulación de la fagocitosis de los segmentos externos de los fotorreceptores por el EPR: el receptor de macrófagos CD36, necesario para la internalización de los segmentos externos de los bastones; el receptor tirosinaquinasa c-mer (MerTK), que activa la fagocitosis; y la $\alpha V\beta 5$ integrina, necesaria para la iniciación de la fagocitosis durante el día. La falta de alguna de estas moléculas receptoras puede encadenar diferentes anomalías o enfermedades (D’Cruz et al., 2000; Gal et al., 2000).

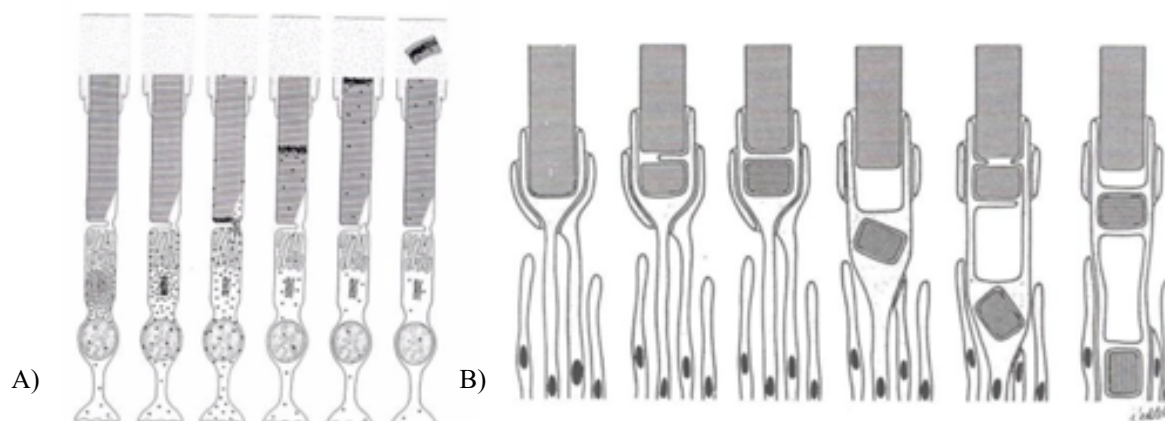


Figura 10. A) Migración de los discos que contienen aminoácidos triturados (puntos oscuros) desde el segmento interno hasta el ápice de los bastones. B) Desprendimiento de paquetes de discos de la zona apical y fagocitosis por las células del EPR. Young, 1971.

En el caso de los conos, las proteínas recién sintetizadas en el segmento interno se difunden a través del segmento externo de una forma más difusa y se incorporan a todos los discos del cono. Estos discos, no llegan nunca a constituir una entidad independiente de la membrana celular, lo cual es una diferencia fundamental respecto a los bastones.

1.1.2.1.3 Membrana limitante externa

Esta membrana es una capa muy fina que está formada por una hilera de uniones especializadas de tipo adherente establecidas entre las células de Müller y los segmentos de los fotorreceptores contiguos, ya que los segmentos internos y externos de los fotorreceptores se encuentran apoyados sobre las prolongaciones de sostén de las células de Müller.

Entre las funciones de la membrana limitante externa (MLE) se encuentran:

- Actuar como barrera metabólica selectiva que regula el paso de sustancias hacia las capas internas de la retina (Gosens et al., 2008; Omri et al., 2010).
- Contribuir al mantenimiento y a la integridad de la capa nuclear externa (CNE) (Campbell et al., 2007; Stuck et al., 2012).

La pérdida de integridad de la membrana limitante externa produce algunas de las distrofias retinianas más frecuentes, como diferentes tipos de retinosis pigmentaria o la Amaurosis congénita de Leber, provocadas por el fallo de algunas de las proteínas que forman parte de las uniones adherentes que forman la MLE (Richard et al, 2006; Alves et al., 2013).

1.1.2.1.4 Capa nuclear externa

La capa nuclear externa está formada por los somas de las células fotorreceptoras, es decir, de los conos y los bastones (Fulton et al., 2009).

1.1.2.1.5 Capa plexiforme externa

Constituye una capa de conexión. Es la región donde se establece la sinapsis entre los axones de los fotorreceptores y las dendritas de las células bipolares y horizontales.

1.1.2.1.6 Capa nuclear interna

La capa nuclear interna (CNI) está compuesta por los somas de cuatro tipos celulares distintos: las células horizontales, las células interplexiformes, las células bipolares y las células amacrinas, así como por los cuerpos de las células de Müller:

- **Células horizontales.** Se trata de neuronas cuyas dendritas contactan a nivel de la capa plexiforme externa con los pedículos de los conos y las esférulas de los bastones, modulando y regulando la transmisión de los impulsos nerviosos enviados por los fotorreceptores (Wässle, 2004). La retina de los humanos presenta dos tipos de células horizontales:
 - Tipo A, sin axón.
 - Tipo B, con axón corto. La retina del ratón tan sólo cuenta con este tipo de células horizontales, que contacta y modula la información nerviosa de ambos tipos de fotorreceptores, conos y bastones (Peichl and González-Soriano, 1994).

- **Células interplexiformes.** Las células interplexiformes fueron descritas por primera vez en 1971 en la retina del gato (Gallego, 1971; Fisher, 1979). Son células de asociación cuyo soma se encuentra en la CNI, desde donde salen las ramificaciones que se extienden hacia las dos capas plexiformes de la retina.
- **Células bipolares.** Las células bipolares tienen su soma en la CNI y se extienden hasta la CPE, donde contactan con los fotorreceptores; y hacia la Capa Plexiforme Interna (CPI), donde contactan con las células ganglionares y amacrinas. Se caracterizan por ser la vía de comunicación entre los fotorreceptores y las células ganglionares y su misión es transmitir esta señal desde los fotorreceptores a las células ganglionares y amacrinas. En la retina humana existen dos tipos de células bipolares: las que establecen sinapsis con bastones y las que lo hacen con conos.

En la CPE, las células bipolares pueden responder al glutamato liberado por los fotorreceptores hiperpolarizándose (células bipolares ON) o despolarizándose (células bipolares OFF). Las células bipolares de conos (ON y OFF) establecen sinapsis glutamatérgicas con las células ganglionares y amacrinas. Sin embargo, las células bipolares de bastones (únicamente ON) sólo establecen sinapsis con las células amacrinas (Kuffler, 1953; Pignatelli and Strettoi, 2004).

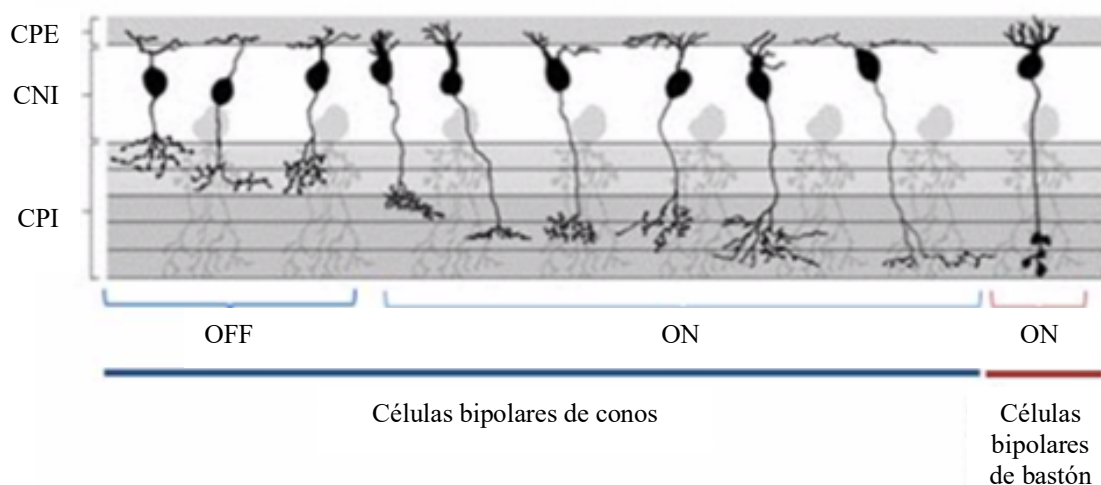


Figura 11. Esquema de los diferentes tipos de células bipolares de la retina. Sobre la línea azul se representan los tipos de células bipolares de conos. Encima de la línea roja vemos la única célula bipolar de bastón que es tipo ON. Adaptado de Pignatelli and Strettoi, 2004.

- **Células amacrinas.** Las células amacrinas tienen su cuerpo celular de forma triangular en la CNI y envían prolongaciones que se extienden por la CPI. No tienen axón, por lo que no reciben conexiones directas de los fotorreceptores, sino que tan sólo establecen sinapsis con las células bipolares y con otras células amacrinas (Kuffler, 1973). Por lo tanto, forman la vía de asociación lateral a nivel de la CPI. Su función es controlar la información que llega a las células ganglionares.

Algunas células amacrinas tienen su soma en la capa de células ganglionares (CCG) y se llaman células amacrinas desplazadas. Este tipo celular supone el 40% de las neuronas de la CNI de la retina de los mamíferos (Jeon et al., 1998). Se han identificado hasta 25 subtipos diferentes de células amacrinas en la retina de humanos y primates, que se dividen en función del tamaño, sus características morfológicas y el lugar donde realizan sinapsis dentro de la CPI.

1.1.2.1.7 Capa plexiforme interna

Es otra capa de conexión. Es la capa de la retina donde se realizan las sinapsis entre los axones de las células bipolares con las dendritas de las células amacrinas, las células interplexiformes y las células ganglionares.

1.1.2.1.8 Capa de células ganglionares

Esta capa está constituida por los somas de las células ganglionares y algunas células amacrinas desplazadas en esta capa (Turk et al., 2012).

Las células ganglionares poseen un cuerpo celular que se localiza en la capa de su mismo nombre. Constituyen un gran eslabón de células nerviosas retinianas. De hecho, una célula ganglionar (10-30 μm) puede establecer sinapsis con un centenar de células bipolares. Sus ramificaciones contactan con las células bipolares dentro de la CPI. Estas células reciben información directamente de las células bipolares y transmiten potenciales de acción a lo largo de sus axones que se sitúan en la capa de las fibras que forman el nervio óptico, el encargado de llevar la información a los centros superiores de procesamiento visual del cerebro hasta el núcleo geniculado lateral del tálamo para su procesamiento.

En función de su morfología, tamaño y ramificación del árbol dendrítico, pueden distinguirse más de 25 tipos diferentes de células ganglionares en la retina humana, aunque típicamente suelen simplificarse en tres grupos principales: células ganglionares difusas grandes, células ganglionares difusas pequeñas y células ganglionares enanas.

En cambio, en la retina del ratón, las células ganglionares se dividen en tres tipos en función del tamaño del soma y del campo dendrítico (Doi et al., 1995).

Las células ganglionares miden las diferencias dentro de los campos receptores por comparación del grado de iluminación entre el centro y la periferia de la célula, centros ON-OFF, y están diseñadas para detectar el contraste simultáneo de luz en estas zonas (Mwanza et al., 2014). En los campos receptores de centro ON, la luz produce la respuesta más fuerte si incide completamente en el centro, mientras que para su inhibición la luz tiene que incidir completamente en la parte que rodea el centro. Las células ganglionares de centro OFF tienen una organización contraria, apareciendo la inhibición cuando la luz incide en el centro.

1.1.2.1.9 Capa de fibras nerviosas

Está formada principalmente por los axones de las células ganglionares de la retina dispuestos paralelamente a la superficie de la retina en su trayecto hacia la papila óptica para formar el nervio óptico. Además, en esta capa se localizan algunos tipos de células gliales como los astrocitos y la microglía.

1.1.2.1.10 Membrana limitante interna

Es la capa más interna de la retina y está constituida por los pies de las células de Müller. La cara vitreal de los pies de estas células está recubierta por mucopolisacáridos, lo que permite la formación de una membrana basal que establece una barrera entre la retina y el humor vítreo.

En esta capa se sitúa el tejido glial, del que la retina de los vertebrados contiene cuatro tipos, cada uno de los cuales exhibe diferente morfología y distintas características.

La glía fue descrita por Santiago Ramón y Cajal, quien diferenció las células gliales de las neuronas, pero identificándolas como parte del tejido nervioso. Existen muchos tipos de células gliales, cuya función de todas ellas es de soporte de las neuronas (Streit, 2002) y de controlar el ambiente celular en cuanto al suministro de citoquinas (Jäkel and Dimou, 2017).

Las células de la glía tienen unos sistemas de señalización que se pueden extender en forma de oleadas de Calcio (Ca^{2+}) y que se correlacionan con la liberación de glutamato (Vecino E, 2016).

Además de mantener la estabilidad estructural y ayudar en la cicatrización de heridas en tejidos neurales, las células gliales son críticas en el mantenimiento del equilibrio iónico, en la captación de neurotransmisores como el glutamato (Anderson and Swanson, 2000) y en los sistemas de adhesión de la superficie celular, entre muchas otras funciones (Rauen et al., 1999; Carmignoto, 2000).

Las células gliales se pueden dividir en general en dos grupos dependiendo de su función principal: un primer grupo estaría formado por las células de la macroglía (células de Müller y astrocitos) cuya función principal es la de sostén y nutrición de las neuronas y el segundo grupo estaría formado por las células de la microglía, cuya función principal es la de fagocitar los desechos celulares (Thanos et al., 1992).

Las células gliales se dividen en:

- **Células de la macroglía.** La función más importante de estas células es la de sostén y nutrición de las neuronas. Otras funciones de las células macrogliales son mantener las condiciones homeostáticas y regular las funciones metabólicas del tejido nervioso (Ramírez et al., 1996; Gerkau et al., 2017). Se ha demostrado que la gliosis retiniana tiene un impacto negativo en la eficacia de la transducción en la terapia génica (Grüter et al., 2005), la integración de fotorreceptores trasplantados (Barber et al., 2013) y la capacidad de los injertos retinianos (Zhang et al., 2003) e implantes electrónicos (Pardue et al., 2001) para contactar con la retina subyacente.

Por ello, comprender el proceso de formación de la glía representa un desafío muy importante para el avance de muchas terapias oculares, como son la retinosis pigmentaria y la miopía. En la retina encontramos dos tipos de células macrogliales: las células de Müller y los astrocitos.

- Células de Müller (figura 12). En la retina, a diferencia del resto del SNC, no encontramos oligodendrocitos sino células de Müller, que sólo se encuentran en la retina y son el elemento glial predominante (90%) de la retina (Uga and Smelser, 1973). Se disponen radialmente ocupando todo el espesor de la retina, situando sus cuerpos celulares en la CNI:

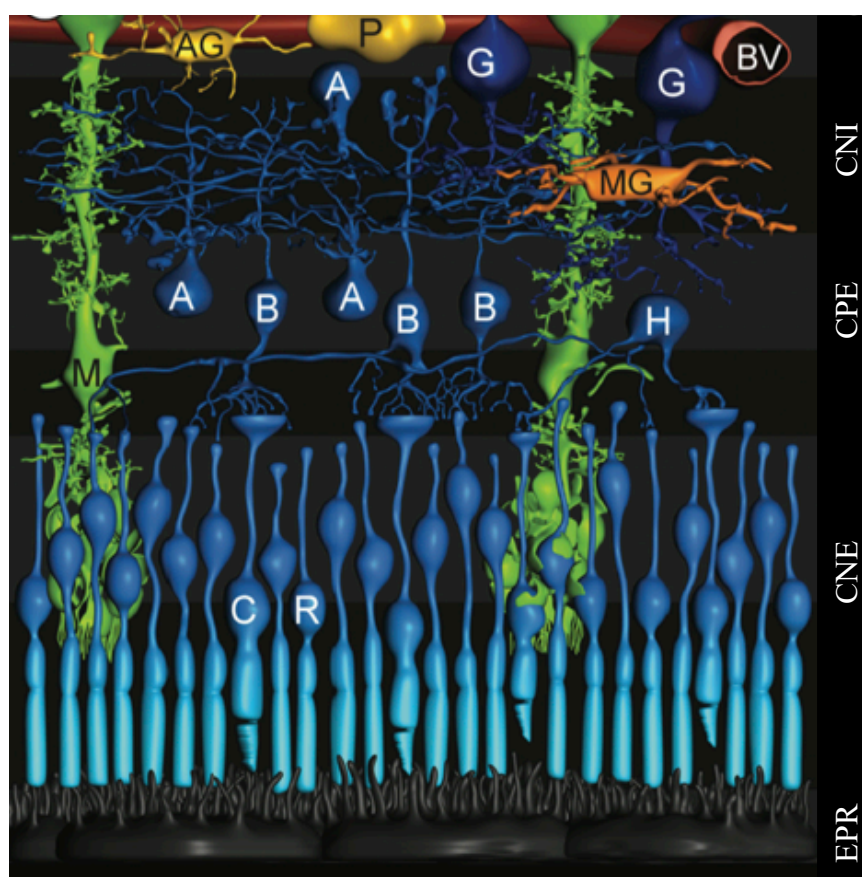


Figura 12. Dibujo esquemático de los constituyentes celulares de una retina humana. Las células de Müller (M) abarcan todo el espesor de la retina. El soma de las células Muller se localiza en la capa nuclear interna. Los pies finales en forma de embudo de las células Müller forman la superficie interna de la retina. Tanto los astrocitos (AG) como las células de Müller entran en contacto con los vasos sanguíneos superficiales y la superficie interna de la retina. Las células microgliales (MG) están ubicadas tanto en las capas plexiformes como en la capa de células ganglionares. A, célula amacrina; B, célula bipolar; G, célula ganglionar; H, célula horizontal. Adaptado de Reichenbach and Bringmann, 2013).

Las células de Müller son células grandes, con un soma situado en la CNI. A diferencia del SNC, en la retina, las células gliales representan el 2% del total de células (Young, 1985). En las porciones más vitreales de la célula de Müller, existen filamentos ricos en la proteína ácida glial fibrilar (GFAP, de las siglas en inglés *Glial Fibrillary Acidic Protein*). Tras un daño, la GFAP es sobreexpresada (Reichenbach et al., 2007) y aparece a lo largo de todo el cuerpo de la célula de Müller (Okada et al., 1990; Fisher and Lewis, 2003). Las células de Müller son un indicador de lesión retiniana. Estas células, en condiciones normales, expresan un nivel bajo de GFAP, mientras que, en respuesta a la inflamación, sobreexpresan esta proteína (Xue et al., 2006), lo considerándose como indicador de activación glial y de que la homeostasis de la retina está comprometida (Ekström et al., 1988; Fan et al., 1996). La regulación al alza de GFAP puede usarse como un indicador lesión retiniana y activación de células de Müller (Luna et al., 2010), que ante determinadas condiciones patológicas son capaces de secretar factores como el PEDF (Eichler et al., 2004) entre otros. Las funciones de las células de Müller (Bringmann et al., 2006) son:

- Dan soporte estructural y funcional a la retina, ya que contactan y envuelven los somas y las prolongaciones de las neuronas retinianas formando unidades funcionales (Reichenbach and Robinson, 1995).
- Mantienen la integridad de la BHR al eliminar desechos metabólicos mediante la regulación de la homeostasis del pH extracelular, controlando el intercambio de iones potasio K^+ . Para evitar los altos niveles de K^+ , la membrana plasmática de las células de Müller es permeable al K^+ , por lo que a través de unos canales absorben los iones liberados por las neuronas al espacio extracelular y lo redistribuyen a otras localizaciones, como el humor vítreo o los vasos sanguíneos (Reinchenbach and Bringmann, 2013).

- Las células de Müller tienen múltiples papeles que son cruciales como son el apoyo al desarrollo neuronal y el procesamiento visual (Newman and Reichenbach, 1996).
- Resisten los entornos de hipoxia proporcionando a la retina nutrientes, activando la glucólisis anaeróbica y oxidando sustratos alternativos, como el glutamato o la glutamina para obtener energía en forma de ATP. Entre otros, las células de Müller metabolizan la glucosa a lactato, principal sustrato de los fotorreceptores en su metabolismo (Stone et al., 1999; Winkler et al., 2000).
- Fagocitan incluso bacterias (Singh et al., 2014).
- Contribuyen al procesamiento de la información visual por la captación de neurotransmisores, evitando la exposición prolongada de las neuronas a los mismos. Es crucial el papel de las células de Müller en el ciclo glutamato-glutamina. La enzima Glutamina Sintetasa (GS) se localiza en las células de Müller (Linser and Moscona, 1979). A través del transportador de glutamato-aspartato (GLAST, de las siglas en inglés *Glutamate Aspartate Transporter*), las células de Müller captan el exceso de glutamato y lo convierten a glutamina. Posteriormente transfieren esa glutamina a las neuronas, que la usan como precursor para la síntesis de glutamato (Bringmann and Reichenbach, 2001; Bringmann et al., 2009).
- Las células de Müller en cultivo son capaces de formar neuroesferas que expresan marcadores de progenitores neurales (Das et al., 2006). Estas neuroesferas originan neuronas y células gliales, así como neuroesferas secundarias y terciarias capaces de dar lugar a nuevas células, lo que les define como verdaderas células madre (Ahmad et al., 2011).

- Astrocitos. La presencia de astrocitos en la retina está ligada a la vascularización. Los astrocitos se localizan en todas las capas de las retinas vascularizadas de los mamíferos (Schnitzer, 1987; Stone and Dreher, 1987), mientras que faltan en la retina de las aves (Reichenbach et al., 1993). Son células gliales que se caracterizan por tener un cuerpo celular aplanado y un gran número de procesos radiales, de forma estrellada. De hecho, son las células más grandes de la glía, con un tamaño de 40 μm . Presentan un cuerpo celular redondeado del cual emergen prolongaciones en todas las direcciones. Estas prolongaciones suelen ser largas y poco ramificadas. Su núcleo ocupa dos tercios partes del citoplasma, de localización central y forma oval. Su escaso citoplasma presenta todos los orgánulos, pero llama la atención la presencia de filamentos intermedios específicos denominados gliofibrillas (8 nm). Este tipo de filamentos están formados por GFAP, presente en la astrogliá (Rueger et al, 1979), es decir, en células de Müller y astrocitos; la cual es usada para su identificación (Kanamori et al., 2005). Mientras que las células de Müller se generan a partir de las células neuroepiteliales de la retina, los astrocitos se generan fuera de la retina y la invaden a través del nervio óptico, por los axones de las células ganglionares (Seiler and Aramant, 1994). Los astrocitos generalmente no invaden las regiones donde no hay células precursoras vasculares, como la fovea (Ramírez et al., 1994, Gariano et al., 1996). Entre sus funciones destacan:
 - Forman parte de la Barrera Hematoencefálica (BHE) (Holländer et al., 1991), ya que sus somas y prolongaciones se disponen sobre los axones de las células ganglionares, sirviéndolos de soporte estructural y nutritivo.
 - Protegen a las neuronas de radicales libres debido a su elevado contenido en antioxidantes y a su capacidad para regenerar glutatión y ascorbato (Wilson, 1997; Schütte and Werner, 1998).

- Participan en el intercambio de desechos entre el humor vítreo y la retina en algunos procesos degenerativos de la retina (Ramírez et al., 2001).
- **Células de la microglía.** El último tipo de célula glial presente en la retina es la microglía. Las células microgliales son las células inmunes residentes predominantes del SNC (Karlstetter et al., 2015), que se han visto implicadas en la patogenia de numerosas enfermedades neurodegenerativas, tales como la enfermedad de Alzheimer (Xu et al., 2009; Perry et al., 2010), la enfermedad de párkinson (Banati and Graeber, 1994; Saijo and Glass, 2011), glaucoma (Neufeld, 1999; Naskar et al, 2002), etc. La presencia de células microgliales en la retina de mamíferos es conocida desde hace casi noventa años. Desde entonces, diferentes estudios han descrito el patrón de distribución de la microglía en la retina de numerosas especies de mamíferos, como el hombre (Penfold et al., 1991), el mono (Boycott and Hopkins, 1981), el conejo (Schnitzer, 1985; Ashwell, 1989), la rata (Terubayashi et al., 1984; Thanos, 1991) y el ratón (Hume et al., 1983). Estudios en otras clases de vertebrados, como peces (Salvador-Silva et al., 2000), anfibios (Goodbrand and Gaze, 1991) y aves (Navascués et al., 1994; Won et al., 2000), han demostrado que dicho patrón de distribución es básicamente similar en la retina de todos los vertebrados. La microglía en la retina se sitúa prácticamente en todas las capas retinianas (Chan-Ling, 1994; Noailles et al., 2014), incluida la capa de células ganglionares, la capa plexiforme interna y la capa nuclear interna (Chen et al., 2015). Derivan de células precursoras de la médula ósea, llegando a la retina con los precursores de los vasos sanguíneos, durante la embriogénesis (Grossmann et al., 2002). En la retina, la parte accesible del SNC, la microglía es un regulador crítico de su entorno inmune (Boehm et al., 2011), jugando un papel fundamental de mediadores primarios del proceso inflamatorio. La microglía ha destacado por tener un papel perjudicial como impulsora de la degeneración de las células de la retina (Zeng et al., 2014). Por eso, existen numerosos estudios que han demostrado que

cuando las células microgliales se inhiben, sus actividades proinflamatorias se amortiguan (Peng et al., 2014) y la progresión de la enfermedad en la retina se atenúa. Mientras que las funciones generales de la macroglía son relativamente bien conocidas, ya que han sido ampliamente investigadas a lo largo de más de un siglo, la microglía constituye un tipo celular de la glía del SNC cuyas funciones son mucho menos comprendidas y han empezado a desvelarse más recientemente. Desde su descubrimiento en el año 1919, se había considerado que las células microgliales estaban exclusivamente implicadas en mecanismos de defensa, siendo frecuentemente denominadas macrófagos del SNC. Sin embargo, recientemente se ha demostrado que la microglía es una población celular específica del SNC, diferente de los macrófagos, y que también presenta otras funciones de gran trascendencia para el desarrollo y homeostasis del SNC, como, por ejemplo:

- Muerte y supervivencia de neuronas inmaduras (Eyo and Dailey, 2013).
- Neurogénesis, formación y remodelación de sinapsis durante el establecimiento de circuitos neurales (Shigemoto-Mogami et al., 2014; Ueno and Yamashita, 2014).
- Oligodendrogénesis (Schafer et al., 2013).
- Vasculogénesis (Arnold and Betsholtz, 2013; Salter and Beggs, 2014).

Por ello, el interés por la microglía se ha disparado recientemente. Se conocen dos estados morfofuncionales de la microglía (figura 13):

- En una retina no lesionada, las células microgliales presentan un pequeño cuerpo celular con forma más o menos ovoide, pequeño, junto con una morfología estrellada con múltiples ramificaciones o prolongaciones cortas, muy finas e irregulares, que rodean los vasos sanguíneos (García-Valenzuela et al., 2005; Santos et al., 2008), actuando como macrófagos residentes (Gupta et al., 2003). Este estado constituye el estado natural de la microglía

en situaciones normales (Cuadros and Navascués, 1998; Hanisch and Kettenmann, 2007). Las células microgliales ramificadas están dotadas de una gran motilidad, emitiendo y retrayendo continuamente sus prolongaciones, para conseguir una activa inspección de su entorno (Davalos et al., 2005; Nimmerjahn et al., 2005).

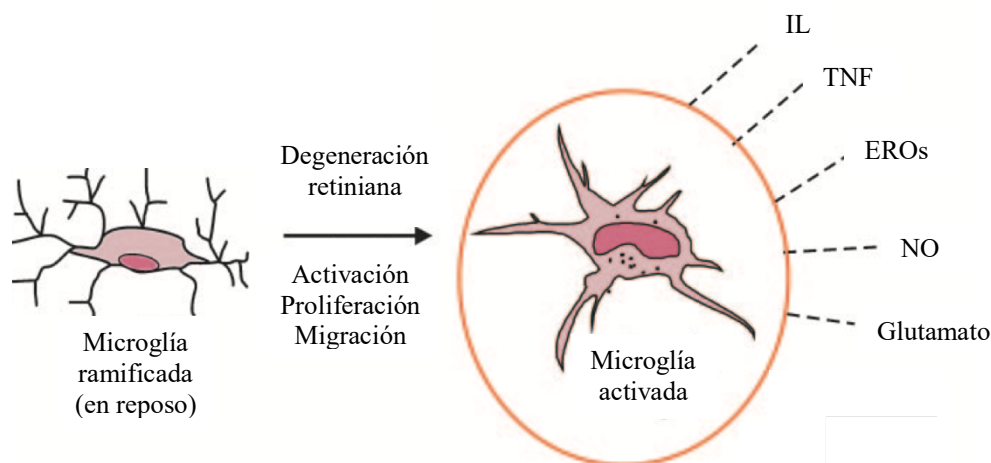


Figura 13. Activación de la microglía relacionada con la degeneración neuronal. La microglía ramificada se mantiene en modo de espera, en reposo, para regular la homeostasis. Varios desencadenantes de la generación de la retina pueden conducir a la activación de la microglía. Las células microgliales ameboides transformadas secretan moléculas de bioactivación. La activación crónica puede llevar a respuestas exageradas de la microglía, lo que lleva a daño retiniano y apoptosis neuronal. Adaptado de Langmann, 2007).

- En condiciones patológicas cuando se produce una lesión o algún trastorno neurodegenerativo, la microglía detecta alteraciones en el entorno y las células de la microglía responden rápidamente asumiendo un estado activo, cambiando su morfología y migrando activamente al tejido dañado (Elliot and Muller, 1981; Carbonell et al., 2005), donde muestran una mayor activación (Kettenmann et al., 2011), adquieren propiedades fagocíticas (Perry and Gordon, 1988) y pasan a denominarse microglía reactiva (Ma et al., 2013). Tienden a acumularse en el espacio subretiniano (Xu et al., 2008; Damani et al., 2011). En este estado, las células son de mayor tamaño, presentan una morfología redondeada o amebode, con un acortamiento y

ensanchamiento de sus ramificaciones (Beynon and Walker, 2012). En este estado, migran al área dañada donde fagocitan los desechos celulares generados (Jimeno et al., 1999). Las células microgliales reactivas son capaces de producir sustancias neurotróficas como el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF, de las siglas en inglés *Brain Derived Neurotrophic Factor*), transportadores de glutamato y antioxidantes, que promueven el correcto funcionamiento neuronal. De hecho, en las primeras etapas de la neurodegeneración de la retina, la microglía desencadena mecanismos de reparación, como la formación de cicatrices gliales. Sin embargo, cuando esta activación es excesiva y se prolonga a lo largo del tiempo, estas células microgliales conducen a una inflamación, generando sustancias y moléculas potencialmente neurotóxicas como NO (óxido nítrico) y otras citoquinas pro-inflamatorias (IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , IL-6, entre otras), y factores citotóxicos (Sobrado-Calvo et al., 2007), en respuesta a la inflamación, lesión o degeneración (Jha et al., 2013), afectando a los fotorreceptores adyacentes, incluyendo a los conos (Gupta et al., 2003), y contribuyendo a la neurodegeneración (Li et al., 2015), con una muerte neuronal irreversible (Schuetz and Thanos, 2004).

Es decir, cuando examinamos un tejido retiniano normal, se observa cómo las células de la microglía se disponen como si fuesen arañas sobre una red, exhibiendo una forma dendrítica en reposo, con una morfología ramificada y con un soma pequeño. En cambio, cuando se activan en respuesta a una lesión, cambian la forma, adquiriendo un aspecto ameboide y produciendo sustancias potencialmente neurológicas como el NO y las citoquinas proinflamatorias (Lucin and Wyss-Coray, 2009; Harry, 2013). De ahí, que muchos estudios sugieran que la activación microglial es perjudicial para la supervivencia neuronal. Es decir, se ha demostrado que la inhibición de la activación microglial causa una reducción de la pérdida neuronal (Gao et al., 2002; Ling et al., 2006). Este proceso de la activación

microglial también sucede en un gran número de enfermedades neurológicas del SNC, como en numerosas infecciones o en el envejecimiento (Benveniste, 1992; Polazzi and Monti, 2010). La activación de las células de la microglía también ha sido escrita en el glaucoma (Tezel et al., 2003; Rojas et al., 2014). Es decir que la microglía en la retina puede ser una de las impulsoras de la neuroinflamación durante las enfermedades degenerativas de la retina (Yoshida et al., 2013; Peng et al., 2014), contribuyendo a la progresión de la enfermedad. Por lo tanto, la microglía representa un objetivo terapéutico para el tratamiento de la degeneración de la RP.

1.1.2.2 Circulación sanguínea de la retina

La retina necesita un suministro de nutrientes y oxígeno para su perfecto funcionamiento (Kooragayala et al., 2015; Li et al., 2016). Por ello, el aporte sanguíneo de las capas de la retina es doble, ya que procede de dos circulaciones diferentes: el sistema vascular de la retina, que se encarga de la nutrición de las capas más internas; y la coriocapilar, que se encarga de la nutrición de las capas más externas. Por un lado, la retina se nutre a partir de los vasos sanguíneos coroideos (Pandey et al., 2017), de los que la retina es el mayor flujo (Foulds, 1990), y son esenciales para el mantenimiento de la retina externa, especialmente para los fotorreceptores.

Este alto flujo de sangre en la coroides está en parte relacionado con la baja resistencia de sus capilares cuyo calibre es mucho más grande comparado con el calibre de los capilares retinianos. Los capilares de la coroides presentan fenestraciones, necesarios para permitir el paso de proteínas del plasma como la albúmina y más concretamente la proteína de unión al retinol (RBP, de las siglas en inglés *Retinol Binding Protein*) que es la proteína transportadora específica de la vitamina A. Hasta alcanzar la retina los metabolitos procedentes de los capilares coroideos deben pasar a través de la membrana de Bruch, del EPR y del espacio entre los fotorreceptores.

Por otro lado, la retina también se nutre a partir de la arteria retinal central, derivada de la arteria hialoidea. Es una rama de la arteria oftálmica que penetra en el interior del ojo a través del nervio óptico y nutre a los estratos internos del tejido. Para ello, la arteria retinal se ramifica una vez alcanzada la retina, formando muchas redes de capilares que se introducen desde el nervio óptico hasta las capas plexiformes (figura 14). A diferencia de lo que ocurre en el ser humano, cuya vascularización está completa en el momento del nacimiento (Zhang, 1994), en el ratón, el desarrollo del sistema vascular proveniente de esta arteria no se completa hasta las tres semanas de edad (Dorrell et al., 2002; Saint-Geniez and D'Amore, 2004).

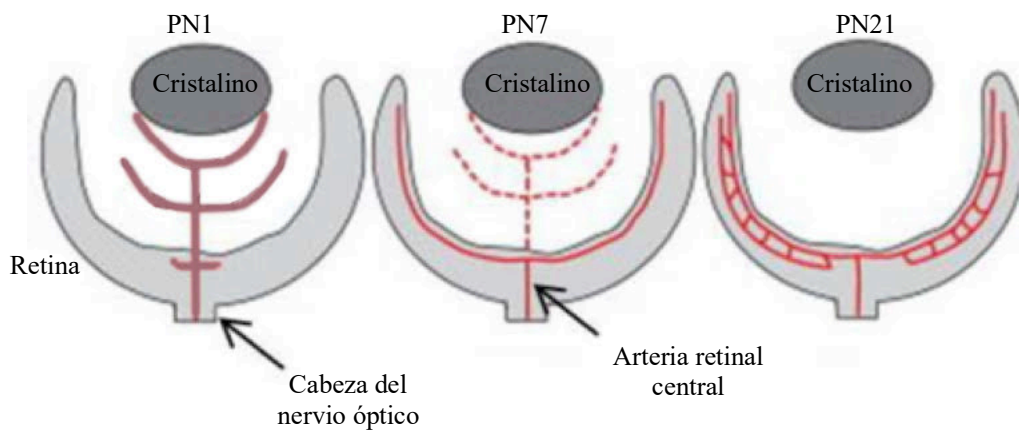


Figura 14. Esquema que representa la vascularización de la retina a partir de la arteria retinal central a diferentes edades de desarrollo postnatal. A día postnatal 1, apenas ha comenzado la vascularización y hay un sistema vascular hialoideo en el humor vítreo completamente definido. A día postnatal 7, éste comienza a eliminarse, a la vez que los vasos sanguíneos retinianos alcanzan la periferia del tejido. A día postnatal 21, la vascularización ha concluido, y el sistema vascular hialoideo ha desaparecido totalmente. Adaptado de Edwards et al., 2012.

Durante la formación del árbol vascular, las capas internas de la retina, así como el cristalino, se nutren a partir del sistema vascular hialoideo fetal, localizado en el humor vítreo. Este sistema vascular se elimina en humanos en el momento del nacimiento. Sin embargo, en el ratón no comienza a eliminarse hasta que la vascularización desarrollada desde la arteria retinal central se encuentra en un estadio avanzado (aproximadamente a la edad de PN7). Es interesante destacar que, a diferencia del cerebro, la retina puede además autorregular su propio flujo sanguíneo (Bill and Sperber, 1990).

1.1.2.3 Barreras retinianas

La retina, como parte del SNC, está protegida de la agresión externa por un sistema de barreras: la BHR interna (endotelio vascular) y la BHR externa (células del EPR), cuya impermeabilidad está asegurada por la presencia de *tight junctions* (uniones estrechas) intercelulares. Tan sólo el agua y los gases pueden difundir a través del espacio intercelular en condiciones normales (Cunha-Vaz, 1979), mientras que los metabolitos son transportados mediante un proceso de transporte activo a través de las células del EPR.

1.1.3 Cámaras intraoculares del globo ocular

La córnea, el iris y el cuerpo ciliar delimitan unos compartimentos llamados comúnmente cámaras intraoculares (Heavner and Pevny, 2012):

- **Cámara anterior** es el espacio situado entre la córnea y el iris. Está rellena por el humor acuoso, un líquido que sirve para oxigenar las estructuras del globo ocular avasculares, como la córnea y el cristalino; y eliminar productos de desecho.
- **Cámara posterior**, situada entre la superficie posterior del iris y la superficie anterior del cristalino. La cámara anterior y posterior están por tanto separadas por el iris y comunicadas por la pupila.
- **Cavidad vítrea**, es el espacio situado entre la superficie interna de la retina, el cuerpo ciliar y la cara posterior del cristalino y, por tanto, ocupa cuatro quintas partes del globo ocular. Está rellena de un gel avascular, el humor vítreo, que da soporte a las estructuras internas. Su transparencia es indispensable para la visión, dando soporte a las estructuras internas. Su volumen es de 4 mililitros. El 98% de su composición es agua y los componentes inorgánicos más importantes son el sodio (Na^+), el potasio (K^+), el calcio (Ca^{2+}), el magnesio (Mg^{2+}) y el cloro (Cl^-).

1.1.4 Cascada de la fototransducción visual

La fototransducción es el proceso a través del que se genera la señal eléctrica (Lagnado and Baylor, 1992; Kawamura, 1993). Se inicia en el segmento externo de los fotorreceptores, transformando la luz en impulsos eléctricos. El proceso comienza cuando el pigmento fotosensible del fotorreceptor absorbe el fotón de luz. En los bastones, el fopigmento es la rodopsina (RHO), que pertenece al grupo de receptores de membrana asociados a proteína G formada por tres subunidades, α , β y γ (Nathans, 1992; Hargrave, 2001) y que se encuentra en los bastones. Está constituida por una parte proteica, la opsina, y una parte no proteica que es un cromóforo derivado de la vitamina A, el 11-cis-retinal (Palczewski, 2006). Este compuesto es inestable y se altera con la energía lumínica cuando interactúa con la retina. Por ello, la activación de este pigmento se produce por la captación de un fotón de luz, cambiando su configuración al isómero trans-retinal cuando la luz incide en el sistema visual. El cambio conformacional de la retina da como resultado la formación de rodopsina activa (figura 15):

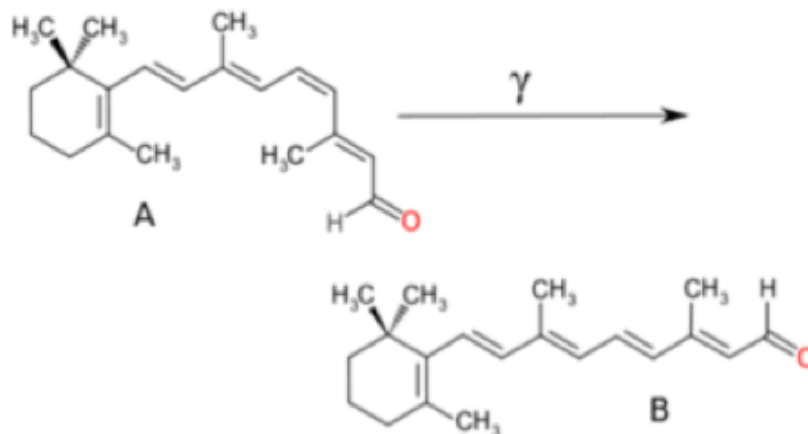


Figura 15. Estructura de la rodopsina (Athanasίου et al., 2018).

Sucesivamente, la rodopsina activada (4×10^7 moléculas por bastón) interactúa con la transducina y la activa (Hamm, 2001). La transducina es una proteína G con tres subunidades, α , β y γ . Esta activación conlleva la disociación del complejo y se une la subunidad α con la RHO activada, provocando la conversión de GDP en GTP, y provocando la separación de las otras subunidades de la transducina inhibitorias β y γ .

El complejo RHO activada + transducina α + GTP se disocia, y se separa la RHO activada, que volverá a activar otras moléculas de transducina, y así sucesivamente, es decir que la activación de las moléculas de transducina por la RHO activada es el primer paso de la amplificación del proceso visual. Para impedir que la transducina siga activándose, las moléculas de RHO se inactivan. Este proceso de inactivación de la RHO se lleva a cabo a través de la enzima RHO quinasa, implicada en la desestabilización de los receptores acoplados a proteína G (Palczewski et al., 2000). El complejo subunidad α - GTP activa la fosfodiesterasa (PDE, de las siglas en inglés *Phosphodiesterase*), formada por dos subunidades catalíticas y dos inhibitorias. La activación de la PDE es la responsable de llevar a cabo la hidrólisis del Guanosín Monofosfato cíclico (GMPc) a 5'GMP (Beavo, 1995). Esta interacción desencadena el cierre de los canales de Na^+ , Ca^{+2} y K^+ dependientes de GMPc que se encuentran en la membrana plasmática del fotorreceptor (Yau, 1994). El cierre de estos canales hace que disminuya la conductancia al Na^+ , lo que produce una negativización del espacio intracelular del bastón, iniciándose la hiperpolarización de los fotorreceptores y la transducción de la señal.

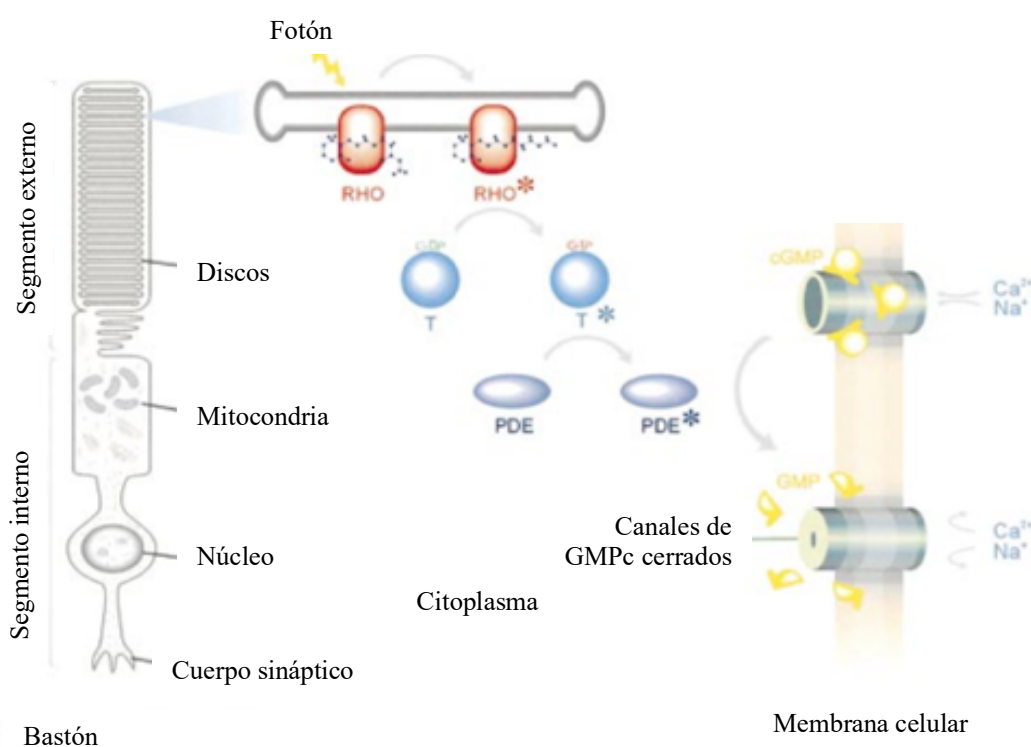


Figura 16. Resumen gráfico de los componentes clave de la cascada de transducción visual. La transducina está indicada por T. Adaptado de Stryer, 1991.

En la CPE, los axones de los fotorreceptores establecen sinapsis con las dendritas de las células bipolares y las células horizontales (Grunwald et al., 1998). Las células bipolares, cuyos núcleos constituyen la mayor parte de la CNI, sinaptan en la CPI con las segundas neuronas, las células ganglionares, y también con las células amacrinas. Los axones de las células ganglionares forman la capa de fibras nerviosas que a través del nervio óptico llegan al cuerpo geniculado externo donde hacen sinapsis con la tercera neurona, cuyos axones se extienden a través de las radiaciones ópticas hasta concluir como hemos visto en el córtex occipital.

1.1.5 Adaptación a la oscuridad

La cascada catalítica activada por la luz debe estar compensada por una reacción de inactivación, para devolver al fotorreceptor a su estado de reposo. Este tiempo de recuperación es vital para que el fotorreceptor pueda generar respuestas ante nuevos estímulos. La adaptación a la oscuridad es la capacidad del sistema visual de obtener visión cuando se produce un cambio de un lugar iluminado a uno donde la intensidad de luz es pequeña. Existen dos mecanismos responsables de la adaptación luz/oscuridad: los dependientes de Ca^{+2} y los independientes de Ca^{+2} (Pugh et al., 1999).

Tal y como se comenta en el apartado 1.1.4, la absorción del fotón de luz desencadena una serie de pasos cuyo final es la hiperpolarización del fotorreceptor y el descenso de los niveles de Ca^{+2} , lo que produce la activación de la recoverina y ésta a su vez activa la enzima guanilato ciclasa que reestablece nuevamente los canales dependientes de GMPc (Weitz et al., 1998). Al restablecerse los niveles de Ca^{+2} , en oscuridad la recoverina se une a la enzima RHO quinasa y es inhibida y la transducina GTPasa canaliza la separación de la transducina y la PDE permitiendo su inactivación al unirse de nuevo a sus subunidades inhibitoras. La RHO fosforilada es capturada por la arrestina, evitando que la primera se una a la transducina, paralizando el proceso. Hasta la fecha, la causa de muchas degeneraciones de la retina se ha identificado como defectos genéticos que conducen a una función reducida de una amplia gama de proteínas involucradas en la cascada de reacción del ciclo visual.

1.2 Fisiopatología del estrés oxidativo y radicales libres

1.2.1 Concepto de estrés oxidativo y radicales libres

Estrés oxidativo es un término ampliamente utilizado que hace referencia a una situación de desequilibrio entre la generación de especies prooxidantes y la eliminación de las mismas, mediante diferentes sistemas antioxidantes (Sies, 1999; Sies, 2015). En una situación de estrés oxidativo, dicho equilibrio se encuentra desplazado hacia la generación de especies prooxidantes, bien por el aumento de la producción de estas especies o por la disminución en los efectos protectores. El estado redox es esencial para la función de las células (Finkel, 2001; Chiarugi, 2003). Así, las EROs, que incluyen iones de O_2 , radicales libres y peróxidos, tanto inorgánicos como orgánicos, están involucradas en numerosos eventos celulares en el sistema nervioso, incluida la retina (Halliwell, 1992). En circunstancias desfavorables, las EROs pueden causar estrés oxidativo en las neuronas, afectando a las macromoléculas intracelulares y provocando la muerte neuronal en el SNC (Halliwell, 1991). Se cree que las EROs participan en una amplia variedad de funciones celulares, incluida la proliferación celular, la diferenciación y la apoptosis (Camhi et al., 1995), ya que se ha demostrado que la adición de EROs o el agotamiento de los antioxidantes celulares podría inducir la muerte celular (Buttke and Sandstrom, 1994). La importancia de las EROs en la ejecución de la apoptosis es controvertida; es probable que las EROS estén involucradas en el mecanismo de transducción de señales para la apoptosis como intermediarios de señalización (Jacobson, 1996).

También se ha demostrado que las EROs actúan como segundos mensajeros intracelulares esenciales para ciertas citoquinas y factores de crecimiento (Levine et al., 1994).

Se denomina Radical Libre (RL) a todas aquellas especies químicas que tienen uno o más electrones desapareados en sus orbitales externos, es decir, aquellas especies en las que el electrón del último orbital necesitaría de otro para poseer una configuración bioquímica y electromagnética estable. Los radicales libres tienden a reaccionar ávidamente con otras moléculas cercanas para completar ese último orbital incompleto. Esta característica las hace intrínsecamente inestables y altamente reactivas, lo que les proporciona una gran capacidad de reaccionar con la mayoría de las biomoléculas (Southorn and Powis, 1988).

Para pasar a un estado estable, un RL debe adquirir un electrón de otra molécula y, en la mayoría de los casos, este proceso convierte a su vez a la molécula de la que se toma el electrón en un nuevo RL. La toma secuencial de electrones por parte de los radicales libres a menudo induce una cascada de reacciones bioquímicas en cadena que pueden dejar a muchas moléculas permanentemente alteradas.

1.2.2 Tipos de especies reactivas

Las especies reactivas más importantes son:

- **Radical superóxido (O_2^-)**. Es el radical más abundante a pH fisiológico (Behar et al., 1970). Aunque es muy inestable porque presenta una vida media de tan sólo unos cuantos milisegundos, es capaz de iniciar reacciones que den lugar a otros intermediarios, a su vez muy reactivos. Es capaz de experimentar reacciones de dismutación, donde a partir de dos radicales O_2^- se produce peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno (O_2) (Grisham et al., 1999).
- **Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)**. No es un radical libre como tal, pero su toxicidad es extremadamente importante debido a que atraviesa con enorme facilidad las membranas celulares (Holley and Cheeseman, 1993). Es un producto estable en ausencia de catalizadores que promuevan su descomposición. Muchas enzimas producen H_2O_2 a partir de O_2 , tales como la superóxido dismutasa, la glucosa oxidasa, etc. Por ejemplo, la enzima catalasa es la encargada de eliminar esta especie reactiva, liberando agua en el proceso.

- **Óxido Nítrico (NO).** El óxido nítrico tiene una gran importancia debido a su función fisiológica, además de ser considerado como un intermediario tóxico importante por su condición de radical libre. El óxido nítrico juega un papel fundamental en numerosos procesos fisiológicos, ya que actúa como regulador del flujo sanguíneo local, inhibe el crecimiento, la inflamación y la agregación plaquetaria.
- **Radical hidroxilo (OH[·]).** El radical hidroxilo es una de las especies químicas más reactivas que se conoce hasta el momento y una de las más tóxicas. Tiene una vida media estimada de alrededor de 10 segundos (Liochev and Fridovich, 1994). Puede formarse in vivo a consecuencia de la radiación de alta energía (rayos X o rayos γ) lo que puede provocar la rotura homolítica del agua corporal. Por el contrario, la luz UV no tiene suficiente energía como para escindir una molécula de agua, pero sí puede dividir el H₂O₂ en dos moléculas de OH[·].
- **Peroxinitrito (ONOO⁻).** El peroxinitrito no es un radical libre como tal, pero sí es un intermediario oxidante que puede protonarse y descomponerse con enorme facilidad, condición que lo convierte en una especie altamente reactiva (Lipton et al., 1993). El peroxinitrito es capaz de inducir la peroxidación lipídica en las lipoproteínas, oxidar los grupos tioles, degradar los carbohidratos y fragmentar el Ácido Desoxirribonucleico (ADN), por lo que lo convierte en un importante mediador en el proceso aterogénico (Beckman and Koppenol, 1996).

Debido al elevado consumo de oxígeno, la exposición a la luz y la presencia de ácidos grasos poliinsaturados, la retina es muy susceptible de sufrir daño por el estrés oxidativo por la acción de los radicales libres anteriormente citados.

1.2.3 Efecto de los radicales libres

Los radicales libres son sustancias muy inestables y altamente reactivos (Flaherty and Weisfeldt, 1988), que pueden interaccionar rápidamente con macromoléculas biológicas, muchas de ellas esenciales para los seres vivos. La oxidación se produce a nivel de las cuatro biomoléculas más importantes: proteínas (oxidándolas y formando agregados moleculares mayores), lípidos de la membrana plasmática celular (provocando su peroxidación), glúcidos y ácidos nucleicos como el ADN, en el que se producen mutaciones (Crawford et al., 1997).

Los radicales libres reaccionan con estas biomoléculas y son capaces de oxidarlas causando pérdida de su función, acumulación de moléculas oxidadas, mutaciones, etc.

- **Daño oxidativo a las proteínas.** Los aminoácidos presentes en las proteínas tienen residuos susceptibles de ser fácilmente atacados por los radicales libres (Stadtman, 2006). Dentro de los aminoácidos fisiológicos, la tirosina y la cisteína son los que más procesos oxidativos sufren (Davies, 1987). Esta oxidación puede dar lugar a un cambio conformacional de la proteína y, por lo tanto, a una pérdida de su función. El daño oxidativo es irreversible y conduce a la desnaturalización de la proteína.
- **Peroxidación lipídica.** La acción de los radicales libres de O₂ sobre los lípidos tiene lugar mayormente sobre los ácidos grasos poliinsaturados (Alexander-North et al., 1994), provocando su peroxidación, que se considera un factor importante en el envejecimiento de las células aeróbicas (Lippman, 1985). Este proceso comienza cuando un RL oxida a un Carbono (C) de la cadena alifática de un ácido graso, se desprende un átomo de hidrógeno, y se forma un radical alquílico (Frei, 1994). Este radical centrado en un átomo de C reacciona con el O₂ y forma un radical peróxido o un peróxido de ácido graso o hidroperóxido. Los radicales peróxidos son muy inestables y rápidamente se descomponen en otros productos y pueden reaccionar con cadenas laterales de otros ácidos grasos poliinsaturados adyacentes, con lo que se propaga la reacción en cadena radicalaria (Witz, 1989; Halliwell, 1994). El resultado de esta peroxidación es la pérdida de la flexibilidad y de las funciones secretoras, así como la ruptura de los gradientes iónicos transmembrana.

- **Daño oxidativo a los glúcidos.** Los radicales libres atacan a los glúcidos de diferentes formas. Los polisacáridos son despolimerizados por los radicales libres. Esta acción provoca la pérdida de la función estructural de los mismos y da lugar a numerosos procesos degenerativos (Borel et al., 1998). Sin embargo, los monodisacáridos y los disacáridos resisten a la acción de las especies reactivas ya que la glucosa constituye un captador del O_2^- que, al retenerlo, impide su acción sobre otras moléculas. Por otro lado, la manosa y el manitol son capaces de eliminar el OH^- (Albertini et al., 1996).
- **Mutaciones en el ADN.** Los ácidos nucleicos también son susceptibles de sufrir los efectos del estrés oxidativo en todos sus componentes. Se sabe que el O_2 es capaz de adicionarse a las bases nitrogenadas del ADN formándose el radical peroxilo. La alteración más frecuente que se observa es la oxidación de la base guanosina, produciendo 8-hidroxi-2'deoxiguanosina. Su importancia reside en su poder mutagénico ya que durante la replicación produce transversiones del nucleótido timina por la citosina (Shibutani et al., 1991), originando la correspondiente mutación (Halliwell and Aruoma, 1991; Breen and Murphy, 1995). Por ello, las lesiones oxidativas al ADN parecen estar implicadas no sólo en el envejecimiento celular, sino también en la patogénesis de las enfermedades asociadas al cáncer.

1.2.4 Sistemas productores de estrés oxidativo

Un compuesto se puede transformar en un radical libre de diferentes formas: ganando un electrón, perdiendo un electrón o por fusión homolítica simétrica de una unión covalente.

Los radicales libres, aparte de las fuentes endógenas, pueden también proceder de fuentes exógenas o externas. Por ejemplo, con la dieta, con el humo de tabaco, con la polución ambiental, con el Ozono (O_3), etc. (Prior et al., 1995).

Pese a que los radicales libres provienen a través de fuentes exógenas y endógenas, en este estudio tan sólo nos centraremos en las fuentes endógenas, entre las que destacan:

- **Xantina Oxidorreductasa (XDH).** La XDH es un enzima muy versátil que se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza. Cataliza la oxidación de muchos sustratos, bien sean endógenos como las purinas, o exógenos como el etanol. La principal función a nivel fisiológico de la XDH es la oxidación de la hipoxantina y de la xantina a ácido úrico. La XDH in vivo se encuentra fundamentalmente bajo la forma NAD⁺ dependiente deshidrogenasa. Esta forma es un homodímero y cada una de sus subunidades tiene un peso molecular aproximado de 150 KDa (Saksela and Raivio, 1996).
- **Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato Oxidasa (NADPH).** La enzima NADPH oxidasa, presente en la membrana plasmática de distintos tipos celulares, es una importante fuente biológica de producción del O₂⁻. El complejo NAD(P)H oxidasa puede estar formado por diferentes subunidades en función del tipo celular y del tejido donde se esté produciendo (Chamulitrat et al., 2004). Además, cada una de ellas puede estar activada por diferentes proteínas homólogas (Cheng and Lambeth, 2005). En un principio, se determinó la estructura y función de la NAD(P)H oxidasa en los neutrófilos. Esta enzima es un complejo formado por un dominio con actividad reductasa compuesto por una flavoproteína y un citocromo b558. Cuando el complejo está activo, transfiere electrones del NAD(P)H citosólico al O₂ del espacio extracelular generando O₂⁻ (Cross and Segal, 2004). La NAD(P)H oxidasa vascular tiene algunas funciones similares a las que se halla en los neutrófilos. Se diferencian, sin embargo, en que la oxidasa vascular produce O₂⁻ en menor cantidad, pero de manera más constante a lo largo del tiempo (Cai and Harrison, 2000). Es importante destacar que la actividad de la NAD(P)H oxidasa vascular está regulada por citoquinas, hormonas y fuerzas mecánicas que se conoce que participan en la patogénesis de la enfermedad vascular (Griendling et al., 2000).

1.2.5 Sistemas antioxidantes de gran importancia biológica en la retina

La retina es la parte del SNC que percibe y procesa la información visual. Pero los fotorreceptores de la retina son altamente susceptibles a la oxidación (Tanito et al., 2002), ya que están expuestos a un rango amplio de intensidades de luz. Por eso, los distintos tipos de oxidantes producidos en las células requieren que las células tengan mecanismos antioxidantes de defensa celular contra la elevación de las EROs (Halliwell, 1987; Ames et al., 1993).

Los seres vivos han desarrollado una serie de mecanismos antioxidantes, diseñados para defender a la retina de la acción de los radicales libres (Puertas et al., 1993), bien al prevenir la formación de radicales libres, o bien al eliminar las moléculas dañadas (Frei et al., 1988).

1.2.5.1 Sistemas de defensa antioxidantes

Se trata de mecanismos intracelulares que eliminan las especies reactivas de oxígeno una vez formadas y/o reparan sus efectos. En este estudio nos centraremos en las enzimas Superóxido Dismutasa (SOD) y catalasa como enzimas detoxificadoras de especies reactivas de oxígeno y como sistemas reparadores comentaremos la enzima 8-Oxoguanina Glicosilasa 1 (OGG1), como proteína reparadora de la acumulación de 8-oxo-dG en el ADN:

- **SOD.** Se encarga de catalizar la reacción de dismutación de los O_2^- mediante su transformación en H_2O_2 (figura 17) que, a su vez, puede ser destruido por las actividades de la catalasa o de la glutatión peroxidasa (Usui et al., 2011). A nivel intracelular, existen dos formas de SOD. Ambas difieren entre sí por los grupos prostéticos metálicos que forman parte de su estructura, y se nombran SOD Mn dependiente (SODMn) y SOD Cu/Zn dependiente (SODCu/Zn), respectivamente (Warner et al., 2004).

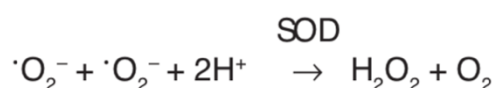


Figura 17. Enzima superóxido dismutasa, una familia de metaloproteínas que catalizan la reacción de dismutación del radical superóxido a H_2O_2 .

- **Catalasa.** Es una enzima con cuatro subunidades idénticas dispuestas tetraédricamente, que contiene cuatro grupos de ferro-protoporfirina por molécula. Es una de las enzimas más eficaces. Tanto, que no puede ser saturada por H_2O_2 a ninguna concentración, catalizando su conversión en H_2O y O_2 , para proteger a las células del H_2O_2 que se genera en su interior. Esta enzima captura el H_2O_2 antes de que pueda escapar de la célula y lo convierte en O_2 molecular. Por ello, es una proteína importante en la protección del organismo frente al estrés oxidativo grave.
- **OGG1.** Es una enzima reparadora del ADN. La OGG1 es la enzima responsable de la escisión de 8-oxo-dG, base mutagénica más abundante derivada del ataque oxidativo al ADN y considerada como biomarcador del daño oxidativo en el ADN (Lunec et al., 2000).

1.2.5.2 Sistemas captadores de ROS o “scavengers”

Se trata de unos sistemas que enlentecen las reacciones de oxidación en cadena o atrapan a las EROs, transformándolas en sustancias menos agresivas y recuperando aquellas proteínas oxidadas previamente. En este apartado se engloba los sistemas glutatión y tiorredoxina (TRX), entre otros.

1.2.5.2.1 El sistema glutatión

Se denomina sistema glutatión al conjunto formado por el glutatión y las enzimas relacionadas con su metabolismo, que son responsables del mantenimiento de su estado redox en condiciones fisiológicas (Ganea and Harding, 2006). El glutatión (figura 18) es el tiol no proteico más abundante en las células de mamíferos, siendo importante para el mantenimiento de la viabilidad celular (Stenberg et al., 1993; Wang et al., 2019) y en la defensa contra los oxidantes (Sies, 1989; Dickinson and Forman, 2002). Es el principal antioxidante celular, junto con la vitamina C, por su importancia bioquímica (Winkler et al., 1994).

De hecho, numerosos estudios han mostrado que el agotamiento de glutatión aumenta el riesgo de lesión oxidativa en los tejidos (Thor et al., 1982), ya que también se encarga de eliminar agentes extraños (Meister, 1988).

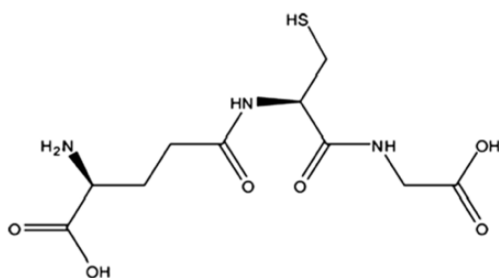


Figura 18. Estructura química del glutatión. Forman et al., 2009.

Es un tripéptido que está constituido por tres aminoácidos, tal y como muestra la figura 19: el ácido glutámico, la cisteína y la glicina. Su estructura, junto a la presencia de un grupo tiol libre (-SH) le confiere ciertas características que hacen que el glutatión tenga una funcionalidad amplia e importante en la célula al eliminar los radicales libres y otras EROs, siendo un compuesto muy activo con todo tipo de sustancias.

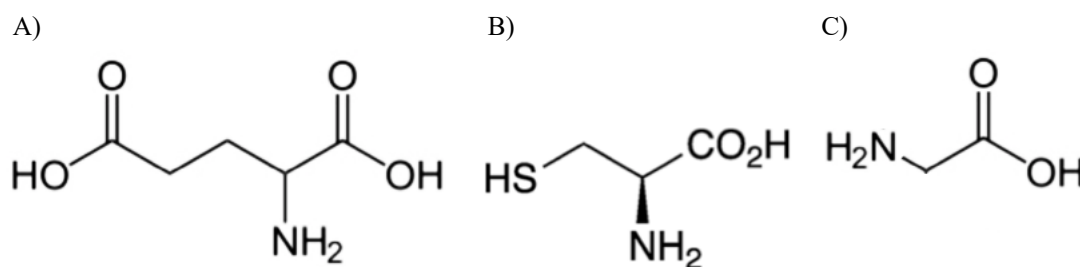


Figura 19. Estructura química de los aminoácidos que conforman la molécula de glutatión. A) Ácido glutámico. B) Cisteína. C) Glicina.

El glutatión se puede encontrar en dos formas según su estado de óxido-reducción: como glutatión reducido (GSH) o como glutatión oxidado (GSSG), que está compuesto por dos moléculas de GSH unidas por un puente disulfuro entre las cisteínas (Kaplowitz et al., 1985).

El glutatión desempeña numerosas e importantes funciones metabólicas (Ballatori et al., 2009; Mari et al., 2009). Una de ellas es la de proteger a la célula contra los radicales libres, los peróxidos y otros compuestos tóxicos (Meister and Anderson, 1983; Sies, 1999). El glutatión puede reaccionar directamente con los radicales libres sin intervención enzimática alguna y detoxificarlos, o bien, puede reducir los peróxidos formados por medio de la glutatión peroxidasa (Sreekumar et al., 2012).

El glutatión también desempeña un papel central en la muerte celular, ya que se ha demostrado que los niveles de glutatión influyen en la expresión y en la actividad de las caspasas y otras moléculas de señalización importantes en el proceso de la apoptosis (García-Ruiz and Fernández-Checa, 2007).

También se ha comprobado que la falta de glutatión puede producir muerte celular en la retina (Maher and Hanneken, 2005; Roh et al., 2007), por lo que el glutatión tiene un papel activo no solamente como un antioxidante contra el estrés oxidativo, sino también en la regulación de la muerte celular (Franco and Cidlowski, 2009).

1.2.5.2.1.1 Metabolismo del glutatión

Cuando se produce una situación de estrés oxidativo, el glutatión se agota (Dringen, 2000; Lu, 2009) y se oxida a GSSG por medio de la reacción catalizada por la glutatión peroxidasa (GPX) en presencia de H_2O_2 , que está formada por cuatro subunidades idénticas y cada una de ellas contiene un residuo de selenocisteína es esencial para su actividad enzimática, contribuyendo así a la protección de células de mamíferos contra el daño oxidativo.

En los mamíferos se han detectado seis isoenzimas diferentes de GPX:

- La GPX citosólica o mitocondrial (GPX1) reduce los hiperóxidos de ácidos grasos y el H_2O_2 a expensas del glutatión. La GPX1 se encuentra predominantemente en los eritrocitos, en el riñón y en el hígado.
- La GPX2 citosólica y la GPX3 extracelular se detectan escasamente en la mayoría de los tejidos, excepto en el tracto intestinal y en el riñón respectivamente.
- La GPX4 se localiza tanto en la fracción citosólica como en la membrana, donde reduce de forma directa y junto a la GPX1, a los hidroperóxidos de los fosfolípidos (Comhair et al., 2002). La GPX4 se expresa mayoritariamente en las células del EPR y en los testículos.
- Se ha detectado una isoenzima GPX5 que no guarda relación con el selenio y se expresa en muy baja concentración.
- Por último, se ha identificado la GPX6, cuya expresión se restringe a los embriones y al epitelio olfativo de los adultos.

1.2.5.2.1.2 Síntesis del glutatión y su regulación

La mayoría (80–85%) del GSH se sintetiza a partir de sus aminoácidos en el citosol de las células de los mamíferos en dos pasos en los que se requiere ATP. En la síntesis de GSH intervienen dos enzimas. La primera es la γ -glutamilcisteínaligasa (GCLs), que da lugar a la γ -glutamilcisteína a partir de L-glutámico y L-cisteína. En el segundo paso actúa la glutatión sintetasa (GS), agregando glicina al dipéptido γ -glutamil cisteína (Meister and Tate, 1976).

La síntesis de GSH a partir de sus aminoácidos implica dos etapas enzimáticas que requieren ATP (figura 20): formación de γ -glutamilcisteína y formación de GSH.

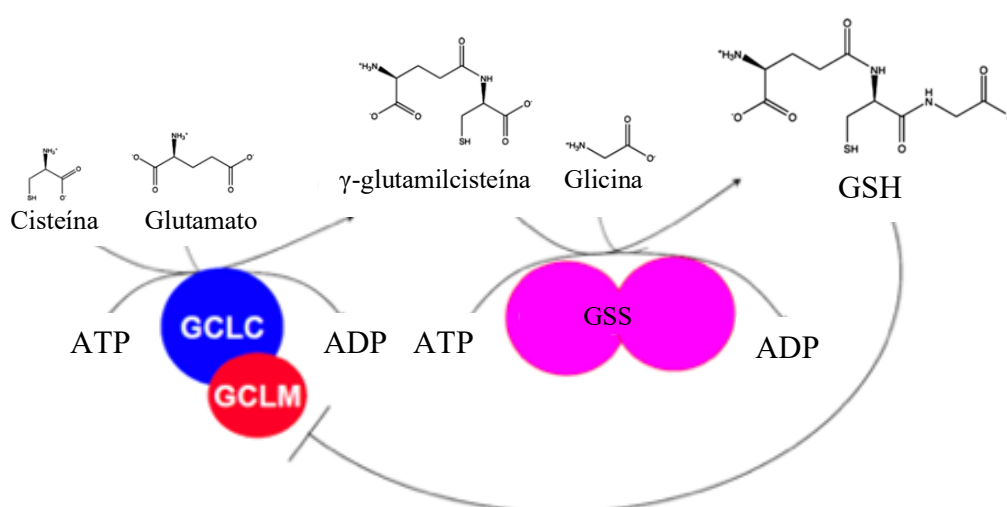


Figura 20. Síntesis del glutatión. La síntesis del glutatión se produce a través de un proceso enzimático en dos pasos. El primer paso es catalizado por la γ -glutamilcisteínaligasa. El segundo paso es catalizado por la glutatión sintetasa, que agrega la glicina para formar glutatión. Adaptado de Lu, 2013.

El primer paso de la biosíntesis del glutatión es limitante de la velocidad y está catalizado por la GCL, que se compone de una subunidad catalítica pesada (GCLC, 73 kDa) que puede ser inhibida por el GSH (Huang et al., 1993) y una subunidad reguladora o modificadora (GCLM, 31 kDa); ambas codificadas por diferentes genes. La GCLC muestra toda la actividad catalítica de la enzima (Seeling et al., 1984). La GCLM es enzimáticamente inactiva (Yang et al., 2001), y la subunidad catalítica posee la capacidad de inhibición por retroalimentación. Los cambios en la actividad de la GCL pueden ser el resultado de una posible regulación a múltiples niveles, que afecten a la subunidad catalítica, a la reguladora o a ambas.

El segundo paso en la síntesis del glutatión es catalizado por la glutatión sintetasa. La GS es una enzima homodímera que cataliza el segundo paso de la biosíntesis del glutatión en una reacción ATP dependiente donde se condensan la γ glutamilcisteína y la glicina para formar el glutatión. La glutatión sintetasa está compuesta por dos subunidades idénticas de 118 kDa cada una y no está sujeta a inhibición por retroalimentación por parte del GSH (Oppenheimer et al., 1979). Las mutaciones presentes en el gen que codifica esta enzima producen la deficiencia severa de GS. Esta enfermedad se transmite de forma autosómica recesiva, y se pueden observar 2 fenotipos:

- Anemia hemolítica aislada.
- Enfermedad multisistémica con anemia hemolítica, 5-oxoprolinuria y disfunción neurológica asociada con el síndrome hemolítico (Ristoff and Larsson, 1998).

El glutatión se distribuye en muchos orgánulos intracelulares, incluido el retículo endoplásmico, el núcleo y las mitocondrias (figura 21). Aunque la mayor parte de la actividad glutatión peroxidasa se desarrolla en el citosol, el 10–15% está en la mitocondria (Ketterer B, 1986) y un pequeño porcentaje está en el retículo endoplásmico (Meredith and Reed, 1982; Hwang et al., 1992). En el núcleo, por ejemplo, el GSH mantiene los grupos sulfhidrilos presentes en proteínas esenciales para la reparación y expresión de ADN (Valko et al., 2007).

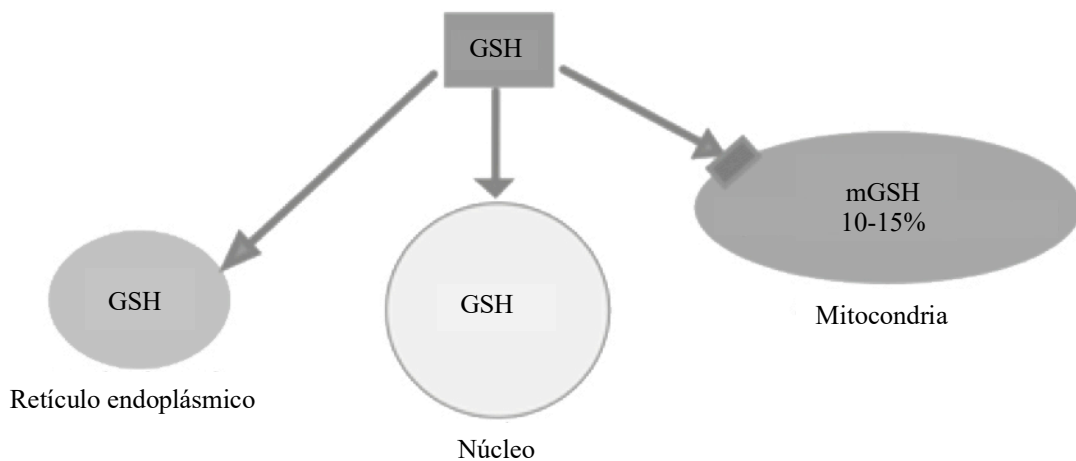


Figura 21. Distribución del glutatión. Una vez sintetizado, el glutatión se distribuye en el retículo endoplásmico, en el núcleo y en las mitocondrias. Adaptado de Mari et al., 2009.

Las mitocondrias son un excelente ejemplo de orgánulos cuya función está estrechamente relacionada con el mantenimiento del equilibrio redox. Las mitocondrias, a pesar de la presencia de una amplia gama de enzimas antioxidantes y desintoxicantes, son la principal fuente de EROs, la mayoría de las cuales se originan en la cadena respiratoria mitocondrial (Kaelin, 2005; Orrenius et al., 2007).

Aunque las mitocondrias están expuestas a la generación constante de especies oxidantes, este orgánulo permanece funcional debido a la existencia de un sistema de defensa antioxidante encargado de reparar el daño oxidativo generado durante el metabolismo aeróbico normal. El principal sistema de tamponamiento redox en la mitocondria es el sistema de glutatión.

Dentro de la matriz mitocondrial, la superóxido dismutasa dependiente de manganeso (MnSOD) convierte O_2 en H_2O_2 . Si la acumulación de H_2O_2 no está limitada, puede difundirse al citosol o participar en una cadena de reacciones que generan radicales libres más reactivos, como el OH^\cdot , que puede oxidar los componentes mitocondriales (proteínas, lípidos y ADN).

Por lo tanto, la mitocondria debe garantizar un equilibrio entre la actividad de MnSOD y el ciclo redox de GSH para eliminar el H_2O_2 de manera eficiente (Fernández-Checa and Kaplowitz, 2005).

Debido a que las mitocondrias carecen de catalizador, el metabolismo del H_2O_2 se realiza principalmente por GSH, con la participación de la GSH peroxidasa o peroxirredoxina, y por la posterior conversión de GSSG de nuevo en GSH por parte de la reductasa GSSG dependiente de NADPH.

Por ese motivo, el GSH mitocondrial es esencial en la defensa principal contra el daño oxidativo de las membranas mitocondriales al garantizar la reducción de los grupos de hidroperóxido en los fosfolípidos y otros peróxidos de lípidos a través de las acciones de las GSH-S-transferasas mitocondriales y de la enzima GSH-Peroxidasa (GPX4), una enzima asociada a la membrana que se localiza parcialmente en el espacio intermembranal de la mitocondria (Chen et al., 2002; Savaskan et al., 2007) siendo una enzima de defensa crítica para proteger las membranas contra el estrés oxidativo.

1.2.5.2.2 El sistema tiorredoxina

Las proteínas de la familia TRX son proteínas que contienen el centro activo Cys- Gly-Pro-Cys (Powis and Montfort, 2001). El sistema TRX (Nordberg and Arnér, 2001; Sreekumar et al., 2009) está constituido por dos tiorredoxinas y varias tiorredoxinas reductasas (TRXR) (Gauntt et al., 1994; Ohira et al., 1994) que se encuentran en diferentes localizaciones celulares y subcelulares (Wollman et al., 1988; Rundlöf and Arnér, 2004). Por un lado, se encuentra la TRXR1 citosólica y, por otro, la TRXR2 mitocondrial (Spyrou et al., 1997; Lee et al., 1999).

Se sabe que el sistema TRX (Pahl and Baeuerle, 1994) es un regulador redox intrínseco (Schenk et al., 1994; Makino et al., 1996). Este sistema participa en una amplia gama de funciones dentro de la célula, incluidas la protección contra el estrés oxidativo (Holmgren, 2000), la síntesis de precursores de ADN, la regulación de la proliferación y diferenciación célula, el control de la muerte celular y la modulación del sistema inmunológico (Gromer et al., 2004; Arnér and Holmgren, 2006). También presenta funciones antiinflamatorias (Nakamura et al., 1997; Nakamura, 2001).

1.3 Retinosis pigmentaria. Definición

El término retinosis pigmentaria (RP) describe a un conjunto heterogéneo de trastornos o enfermedades oculares de carácter degenerativo y hereditario, que producen una grave discapacidad visual (Wright et al., 2010; Daiger et al., 2013) y en muchos casos conduce a la ceguera total. Se trata de una distrofia difusa de la retina, que provoca alteraciones de los tipos celulares de la retina e incluso del sistema vascular (Milam et al., 1998).

Todo esto ocasionado como consecuencia de la degeneración progresiva del EPR y la muerte de las células fotorreceptoras de la retina periférica (principalmente bastones en la mayoría de los casos, responsables de la visión nocturna o con luz tenue) (Kajiwara et al., 1994), aunque en estadios más avanzados puede afectar a los fotorreceptores de la retina central (conos, responsables de la visión diurna y la principal fuente de visión en los seres humanos) (Ogilvie et al., 1997), debido a que, tras la muerte de los bastones, el nivel de O₂ en la retina está notablemente elevado (Yu et al., 2004; Komeima et al., 2008), lo que lleva a la ceguera completa (Portera-Cailliau et al., 1994; Punzo and Cepko, 2007). También se ven afectadas las células ganglionares (Ferrari et al., 2011).

Aunque en la mayoría de los pacientes se trata de una enfermedad bilateral y simétrica en la que los dos ojos se afectan de manera simultánea, en un 20-30% de todos los casos, el deterioro de uno de los ojos es anterior al otro, con una diferencia de 5 o más años (Marmor, 1991; Grover et al., 1997).

1.3.1 Fisiopatología y remodelación de la retina

El inicio y la progresión de la enfermedad desencadenan una cascada de desórdenes en la retina que desembocan en graves alteraciones de la percepción visual. Aunque los mecanismos fisiopatológicos no se conocen bien, la degeneración producida por esta dolencia afecta a la estructura y función de las células de la neurorretina y la consecuencia final es la muerte de los fotorreceptores.

Los estudios histológicos han mostrado una pérdida de células en todas las capas retinianas. Las mayores pérdidas de núcleos celulares se localizan en la capa nuclear externa (CNE), seguida de la CCG y de la CNI. La preservación de células en la CNI y en la CCG es menor en la región extramacular que en la región macular de la retina (Humayun et al., 1999).

Durante mucho tiempo, se pensó que, tras la muerte de los fotorreceptores, las demás células retinianas permanecían inalteradas. Sin embargo, la degeneración es seguida por una remodelación con resultados nefastos para la visión.

Tras la muerte de los fotorreceptores, se produce una reorganización de los circuitos retinianos, provocando cambios en la morfología y en el establecimiento de nuevas sinapsis entre células de la retina. Aparentemente, se forman al azar nuevos circuitos de interconexión neuronal y se pierde la posibilidad de procesar correctamente la información visual. Aunque los mecanismos de muerte de los fotorreceptores no están completamente aclarados, en el proceso de degeneración se pueden diferenciar tres fases (Jones and Marc, 2005):

- **Fase I, periodo de estrés.** Los fotorreceptores sufren un periodo de estrés oxidativo, se observa un acortamiento de los bastones y se produce una desorganización de sus contactos sinápticos.
- **Fase II, muerte de los fotorreceptores.** Se produce la muerte gradual de los bastones conservándose algunas agrupaciones de conos. La microglía se encarga de limpiar los residuos de células muertas y las células de Müller forman paredes fibróticas gliales en toda la retina. Durante este periodo pueden iniciarse también la muerte de algunas neuronas retinianas.
- **Fase III, remodelación neuronal, glial y vascular de la retina** (Jones et al., 2016). Las células neuronales van muriendo progresivamente y las células de Müller rellenan los espacios dejados por ellas. Se produce un adelgazamiento progresivo de la retina (Jones et al., 2003). En las fases tardías, tal y como muestra la figura 22, también pueden mostrar cambios vasculares relacionados con las modificaciones anatómicas, disminuyendo significativamente el flujo sanguíneo retiniano, probablemente como resultado de la remodelación vascular en respuesta a la reducción de la demanda metabólica (Grunwald et al., 1996).

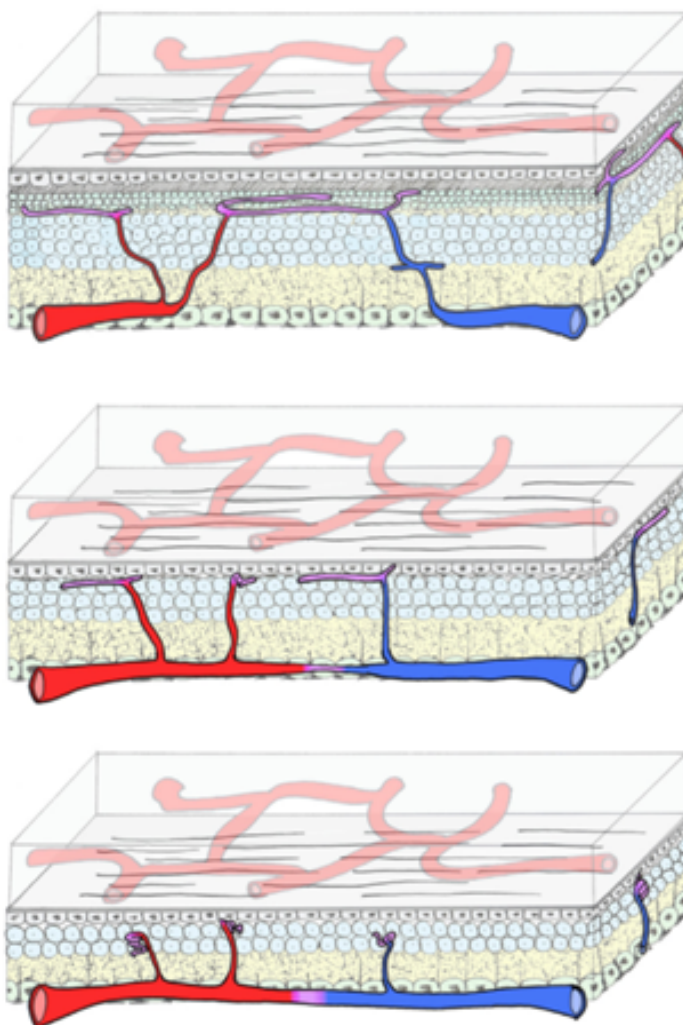


Figura 22. Representación esquemática de la degeneración progresiva de la vasculatura retiniana asociada a la retinosis pigmentaria. Grunwald et al., 1996

La retinosis pigmentaria (RP) implica una remodelación que finalmente destruye la organización de la retina hasta el punto de que muchas clases de células han desaparecido en las etapas avanzadas de la enfermedad. Así, en la fase III, la retina ya no tiene las características propias y reconocibles de una retina normal.

Las implicaciones negativas de estos cambios para el rescate de la visión son sustanciales y deben abordarse inmediatamente para que las estrategias de rescate de la visión tengan éxito, debido a que actualmente se trata de una enfermedad que no tiene tratamiento hoy en día (Delyfer et al., 2004).

1.3.2 Epidemiología

La RP se trata de la cuarta patología más frecuente del conjunto de las retinopatías hereditarias en todo el mundo, después de la retinopatía diabética, el glaucoma y la degeneración macular asociada a la edad (DMAE). La retinosis pigmentaria es una enfermedad rara que presenta una prevalencia mundial de alrededor de 1 de cada 4000 individuos aproximadamente (Boughman et al., 1980; Jay, 1982). Se calcula que existen más de un millón de personas afectadas por esta enfermedad en el mundo (Anasagasti et al., 2012).

Más concretamente en nuestro país, en España, existen aproximadamente 15.000 afectados por esta enfermedad (Ayuso et al., 1995; Carracedo et al., 2011).

1.3.3 Genética de la retinosis pigmentaria

La RP no es una enfermedad única, sino que se trata de un conjunto de patologías degenerativas de la retina con diferentes etiologías. A la RP se le han atribuido una amplia variedad de causas, pero la hipótesis más probada está basada en la presencia de mutaciones en los genes que codifican las proteínas y las enzimas de la retina. Se conocen más de 100 formas de RP con diferentes genotipos y fenotipos, y el resultado sobre la función visual varía entre los diferentes subtipos. Todo esto hace que exista una gran variabilidad entre los pacientes, incluso entre los miembros de una misma familia, en relación con la edad de inicio, evolución y gravedad de la enfermedad (Hartong et al., 2009; Shintani et al., 2009).

La RP es genéticamente muy heterogénea (Hartong et al., 2006) y por eso, presenta un patrón hereditario muy variable (Humphries et al., 1992; Berson, 1993). Por eso, la misma mutación genética puede causar diferentes síntomas en distintas personas y el mismo síndrome puede ser causado por diferentes mutaciones.

La RP se puede clasificar de acuerdo con su patrón de herencia en (Kaplan et al., 1990):

- **Autosómica dominante** (35-45% de los casos). Una persona afectada de retinosis pigmentaria autosómica dominante tiene un 50% de posibilidades de pasar la enfermedad a cada uno de sus hijos (Fishman et al., 1985; Dryja, 1992).

- **Autosómica recesiva** (25% de los casos) (Humphries et al., 1990). Los padres portadores del mismo gen defectuoso tienen una probabilidad del 25% de tener un hijo afectado y una probabilidad del 75% de tener hijos no afectados, ya que para que una persona esté afectada, tiene que heredar un gen defectuoso de cada uno de sus padres; por el contrario, será portador.
- **Ligada al cromosoma X** (5-15% de los casos). Fue puesta de manifiesto por primera vez en el año 1985 (Bhattacharya et al., 1985). En este tipo de herencia, el gen responsable se encuentra en el cromosoma X. De este modo, solamente los varones padecen la enfermedad y, aunque las mujeres son portadoras, son, en términos generales, asintomáticas.
- **Mitocondrial**, debido a que multitud de mutaciones en el ADN mitocondrial se han asociado frecuentemente a numerosas patologías oftalmológicas hereditarias. Este tipo de mutaciones tan sólo representa una pequeña proporción de todos los casos (5%) (Moraes et al., 1989).
- **Esporádica**. La RP puede presentarse además de forma esporádica, es decir, aquellos casos que se presentan sin antecedentes familiares y resulta difícil, a priori, conocer su patrón de herencia. Los casos aislados o esporádicos constituyen un porcentaje a tener en cuenta en la población afectada por esta patología (30-40% de los casos) (Daiger et al., 2007).

Se han identificado más de 80 genes relacionados con el 60% de los casos documentados de esta enfermedad, pero el 40% restante probablemente posea defectos genéticos todavía no identificados. Existen muchos genes relevantes en la RP.

La comprensión de la patogénesis de la retinosis pigmentaria es esencial para el diagnóstico diferencial y el desarrollo de las opciones terapéuticas. En las últimas décadas, se han hecho progresos excepcionales en la identificación de los genes que causan la RP y con algo más de 80 genes implicados y más de 65 identificados, las principales mutaciones conocidas se han localizado en las células del EPR (Hamel, 2006; Veltel et al., 2008) o en los fotorreceptores, afectando principalmente a los bastones de la retina periférica, mientras que la retina central se mantiene relativamente intacta (Rangaswamy et al., 2010).

Los genes más comunes implicados en la retinosis pigmentaria son:

- En el año 1990, Dryja et al identificaron la primera mutación asociada a la RP en **el gen de la RHO** (Dryja et al., 1990), implicado en el 25% de los casos de la RP autosómica dominante (Palczewski et al., 1999).
- **El gen USH2A**, también conocido como Usherin (Rivolta et al., 2002) está formado por un total de 72 exones (van Wijk et al., 2004). Fueron Eudy JD et al (Eudy et al., 1998) quienes identificaron el gen USH2A que codificaba para una proteína formada por 1551 aminoácidos. Este gen podría causar alrededor del 20% de la enfermedad autosómica recesiva (incluyendo a muchos casos con síndrome de Usher tipo II, en el cual la pérdida visual va acompañada de una severa pérdida auditiva) (Usher, 1935; Vernon, 1969).
- **El gen RPGR** (Moiseyev et al., 2005) que representa alrededor del 70% de la RP ligada al cromosoma X.

En conjunto, estos tres genes pueden llegar a predeterminar alrededor del 30% de los casos de RP.

1.3.4 Clínica de la retinosis pigmentaria

Aunque la aparición de los síntomas en la RP es altamente variable, las manifestaciones típicas se presentan generalmente en la juventud y en la adolescencia temprana. Sin embargo, se ha documentado que la edad de inicio va desde la infancia hasta la edad adulta, pudiendo aparecer los síntomas alrededor de los 40-50 años (Sahni et al., 2011). Por eso, se observan fenotipos con algunos pacientes de aparición temprana y una rápida evolución con una progresión de la enfermedad de alrededor de dos décadas (Valverde-Pérez, 2001), y otros pacientes que muestran una aparición y progresión muy lenta que puede que no les cause nunca la ceguera completa. Independientemente del momento de aparición de los síntomas, se sabe que la retinosis pigmentaria cursa con un proceso degenerativo del sistema visual ya desde la infancia.

Tal y como hemos comentado con anterioridad, aunque la RP es un trastorno altamente variable, porque algunos pacientes desarrollan una pérdida visual sintomática en la edad pediátrica mientras que otros permanecen asintomáticos hasta la mitad de la edad adulta, los signos y síntomas de la retinosis pigmentaria son bien conocidos (Pruett, 1983; Heckenlively, 1987) y la mayoría de los pacientes presentan al comienzo de la enfermedad el patrón clásico de nictalopía con pérdida del campo visual periférico.

El modelo teórico de evolución establece una serie de estadios con un deterioro progresivo de la función visual:

- **Estadio 0.** Se produce la alteración escotópica del electroretinograma. Todavía no se observan alteraciones oftalmológicas y no se pueden reconocer síntomas clínicos visuales.
- **Estadio 1.** Se produce la alteración de la función de los bastones, lo que conlleva a una disminución de la visión nocturna (nictalopía) ocasionada por una disfunción de estos, pero todavía sin alteración del campo visual. Los hábitos de vida de los pacientes no cambian, y la enfermedad pasa desapercibida, ya que muchos pacientes no llegan a reconocer la nictalopía como un síntoma al comienzo de la enfermedad (Heckenlively et al., 1988). Además, el patrón periférico de pérdida visual se combina con el mantenimiento de una buena agudeza visual (AV) y con la ausencia de defectos visuales a lo largo del día, por lo que los pacientes mantienen sus actividades cotidianas diarias (Wert et al., 2014). La mayoría de los pacientes no se percatan de la reducción periférica del campo visual hasta estadios muy avanzados.
- **Estadio 2.** En este estadio se produce el inicio de la degeneración de los bastones. Comienza la reducción periférica del campo visual, la característica visión en túnel (figura 23) como resultado de la distrofia de los bastones, que son los primeros en degenerar y lo hacen de forma gradual. Pero todavía se preserva la visión central, que se mantiene intacta hasta las fases más avanzadas de la enfermedad.

Debido a la degeneración de los fotorreceptores, los pacientes experimentan fopsias en el campo de la visión periférica, teniendo dificultades para realizar actividades nocturnas. Algunos las describen como destellos luminosos mientras otros las describen como partículas brillantes. Estos fenómenos se producen como señales aberrantes procedentes de áreas degeneradas. Otros pacientes presentan dificultades para adaptarse a los cambios de luz, necesitando más tiempo para recuperarse del estrés fotópico (Phelan and Bok, 2000; Bovolenta and Cisneros, 2009). Muchos afectados son diagnosticados en este estadio.

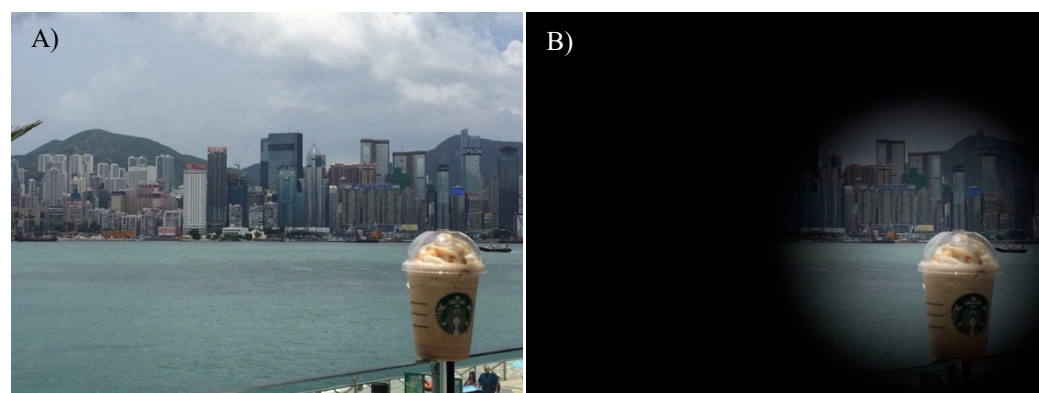


Figura 23. Paisaje observado. A) Sujeto con visión normal. B) Sujeto con retinosis pigmentaria.

- **Estadio 3.** Con la progresión de la enfermedad, tiene lugar el comienzo de la degeneración de los conos, que son importantes para la visión en condiciones fotópicas, la visión cromática y la AV fina (Geller and Sieving, 1993). Por último, también se reduce la circulación sanguínea de la retina. Algunos pacientes manifiestan alteraciones en la percepción de los colores (discromatopsia) que puede afectar a uno o varios tipos de conos (Herse, 2005; Holopigian et al., 2005). La fotofobia es intensa. Comienza la atrofia macular y tanto la visión diurna como la agudeza visual se ven afectadas, con una disminución considerable y progresiva, llegando en muchos casos a ocasionar la ceguera completa. En las fases más tardías de la enfermedad, el resto de las células retinianas (células amacrinas, células bipolares, células horizontales y

células ganglionares) también degeneran, produciendo una remodelación de la retina (Marc et al., 2003) y acentuando aún más los síntomas.

- **Estadio 4.** El examen clínico en esta etapa muestra la ausencia de función visual debido a la pérdida de todos los fotorreceptores de la retina.

Las manifestaciones clínicas más importantes de la retinosis pigmentaria son:

- **Nictalopía.** También denominada ceguera nocturna, se trata de uno de los primeros síntomas que suelen experimentar los pacientes con RP, debido a que los bastones de la retina periférica son los primeros fotorreceptores en deteriorarse. Los pacientes tienden a notar desorientación con poca luz, o que su adaptación en la oscuridad resulta tenue o lenta.
- **Pérdida de campo visual.** Las etapas iniciales comienzan con una reducción del campo visual periférico, con formación de pequeños escotomas, que pueden pasar desapercibidos por el paciente. Se estima que el deterioro promedio de campo visual en los casos de retinosis pigmentaria es del 5% cada año (Berson et al., 1985). En la RP moderada y avanzada, tan sólo pequeñas islas de visión permanecen en el campo visual periférico; más tarde, estas áreas de visión van desapareciendo lentamente.
- **Sensibilidad al contraste.** Se ha mencionado en estudios previos que la capacidad de distinguir objetos a bajo contraste se ve disminuida (Lindberg et al., 1981) en la retinosis pigmentaria. Hay una deficiente adaptación a la oscuridad o a lugares poco iluminados, debido a la mala funcionalidad de los bastones.
- **Fotofobia.** En estadios avanzados, se experimenta una hipersensibilidad al deslumbramiento y a la presencia de luz difusa (días nublados).

Ocasionalmente, el déficit de los conos excede en gran medida al de los bastones, lo que se conoce como degeneración de conos y bastones (Birch et al., 1999), una forma mixta de RP en la que la pérdida de la agudeza visual y una visión defectuosa del color son los síntomas iniciales más prominentes.

1.3.5 Tratamiento de la retinosis pigmentaria

La RP es una enfermedad rara y actualmente no tiene cura (Farrar et al., 2002). En la actualidad, no hay ningún tratamiento eficaz para esta patología, ya que, aunque se hayan identificado algunos genes que causan esta enfermedad, los mecanismos que causan la muerte de las células fotorreceptoras en la retinosis pigmentaria todavía son desconocidos y hoy en día no se dispone de ningún tratamiento (LaVail et al., 1997; Kennan et al., 2005).

Hasta la fecha, se han desarrollado distintas estrategias terapéuticas, aunque, no existe todavía ninguna terapia que detenga la RP. A pesar de los progresos logrados en la investigación con algunos modelos de animales, la reversión de la enfermedad mediante estas terapias sigue siendo frustrantemente difícil de alcanzar en los seres humanos, por lo que las terapias actuales van encaminadas principalmente a intentar ralentizar el proceso degenerativo y poder retrasar la evolución de la patología.

Según el estadio más o menos avanzado en que se encuentre la enfermedad, existe un tipo de terapia más conveniente que otro, siempre tratando de adaptar el tratamiento adecuado al estado de la enfermedad.

1.3.5.1 Terapia génica

En las últimas décadas, la terapia génica se ha desarrollado notablemente dando lugar al inicio de distintos ensayos clínicos. Para alguna de las formas autosómicas recesivas, sería viable el reemplazo de los genes afectados mediante la introducción de copias sanas a través de la replicación de vectores virales (Bainbridge et al., 2008; Smith et al., 2009).

La terapia génica se ha demostrado eficaz en casos genéticamente bien definidos cuando se aplica en un plazo de tiempo adecuado (Maguire et al., 2008; Gorbatyuk et al., 2010). Sin embargo, las posibilidades de aplicar con éxito la terapia génica están seriamente comprometidas por dos factores importantes:

- La terapia génica debe ser aplicada antes del inicio de la degeneración de los fotorreceptores y es menos efectiva a medida que la enfermedad va progresando. Esto es a menudo imposible en la práctica clínica, ya que los pacientes con retinosis pigmentaria son por lo general diagnosticados bastante tarde, cuando la muerte de los conos ya ha comenzado y la mayoría de los bastones (los fotorreceptores que albergan el defecto genético) ya han desaparecido. Por lo que la terapia génica solamente serviría en todo caso, para aquellos pacientes en los que algunos fotorreceptores se mantienen intactos estructuralmente, o antes del inicio de la muerte celular de los fotorreceptores (Rolling, 2004; Colella and Auricchio, 2012).
- La elevada heterogeneidad de la enfermedad dificulta enormemente el conocimiento exacto de los mecanismos patogénicos causantes de la muerte de los fotorreceptores (Rolling, 2004), por lo que la obtención de correlaciones claras entre genotipo y fenotipo no es posible (Colella and Auricchio, 2012). Es decir, la RP es una enfermedad genéticamente muy heterogénea en la que tan sólo el 60% de las mutaciones son conocidas, por eso, las estrategias genéticas dependen de la identificación de la mutación del gen y, por lo tanto, en este caso, tiene una aplicación muy restringida, ya que cada terapia génica debería ser adaptada para cada paciente.

1.3.5.2 Neuroreparación

Otra estrategia para el tratamiento de la retinosis pigmentaria podría ser encontrar algunas terapias que fueran independientes de la mutación, ya que podría beneficiar a un mayor número de pacientes y podría ser más fácil de implementar en la práctica clínica.

Las estrategias de neuroreparación pueden ser:

- **Trasplantes retinianos.** Varios tejidos son susceptibles de ser trasplantados en la retina con objetivos terapéuticos:

- **Células madre pluripotentes.** En situaciones clínicas caracterizadas por la ausencia de dianas celulares para la terapia génica, como en las etapas avanzadas de la RP donde las células fotorreceptoras ya han degenerado completamente, el reemplazo de células de la retina podría ser un medio para preservar o restaurar la visión (Radtke et al., 2008; Schwartz et al., 2015). Las células madre pluripotentes, definidas por su capacidad de proliferación, podrían proporcionar una fuente ilimitada de células de reemplazo apropiadamente diferenciadas (Schwartz et al., 2012). Los tipos de células que deben reemplazarse para garantizar la regeneración de la retina externa son las células fotorreceptoras y las células del epitelio pigmentario. Las células madre pluripotentes con posibilidades terapéuticas en la retina son las células embrionarias y las células progenitoras neuronales, aunque también existen limitaciones técnicas a la hora de dirigir la diferenciación de las células progenitoras adultas hacia fotorreceptores en concreto. Las células del EPR no son fotosensibles, pero permiten la función y la supervivencia de las células fotorreceptoras. El trasplante de células fotorreceptoras plantea desafíos específicos, que incluyen el requisito de la integración sináptica y la elaboración de una estructura de células neuronales. Se ha demostrado que la regeneración de la capa de las células fotorreceptoras perdidas mediante el trasplante de células precursoras de fotorreceptores de bastones derivadas del donante restaura la función visual en ratones rd1 con atrofia retiniana (Singh et al., 2013), pero aún no se ha probado clínicamente. En particular, el reemplazo de células fotorreceptoras también se ha investigado en modelos animales con degeneración retiniana parcial o temprana (Lakowski et al., 2010; Pearson et al., 2012).

- **Células pluripotentes inducidas.** Son un tipo de células maduras procedentes de tejidos diferenciados que existen en tejidos adultos y que, artificialmente, se desprograman para conseguir células madre pluripotentes y se reprograman posteriormente para intentar convertirlas en células retinianas (Siqueira et al., 2011; Park et al., 2014). Aunque en esta técnica, la reprogramación de estas células puede originar algunos problemas, como la activación de ciertos oncogenes debida a la inestabilidad epigenética de las células pluripotentes inducidas comparadas con las células madre embrionarias. Independientemente de su capacidad terapéutica real, esta tecnología es muy interesante en cuanto a la generación de modelos in vivo e in vitro para el estudio de la fisiopatología de la enfermedad.
- **Implantes retinianos electrónicos.** Se está investigando algunos dispositivos electrónicos para estimular directamente a la retina, al nervio óptico o a la corteza visual. En etapas muy avanzadas de la enfermedad, donde la pérdida de fotorreceptores ya está establecida o para la mayoría de los pacientes en los que no se conoce la mutación, los implantes electrónicos o la retina artificial pueden ser una opción apta para la restauración de la visión, ya que las neuronas secundarias pueden mantenerse relativamente bien preservadas. Estas terapias experimentales actuales (Santos et al., 1997; Chow et al., 2004), se basan en la premisa de que algunas neuronas de la retina interna se conservan después de la muerte de los fotorreceptores (Stronks and Dagnelie, 2014; Jayakody et al., 2015). Las prótesis retinianas están destinadas a restaurar la función visual en aquellos pacientes que han sufrido la degeneración de las células fotorreceptoras. El principio es introducir información visual en la retina degenerada a través de la estimulación eléctrica de las neuronas de la retina (Marc et al., 2003), que aún pueden transferir información visual útil al cerebro. Así, en esta situación, la prótesis electrónica estimularía esas neuronas secundarias e induciría una imagen visual (Palanker et al., 2005).

Se han desarrollado diferentes estrategias para activar las neuronas de la retina interna con diferentes electrodos, que se pueden localizar entre la esclerótica y la coroides (Fujikado et al., 2001; Nayagam et al., 2015), en el cuerpo vítreo sobre la superficie de la retina (implante epiretinal) (Humayun et al., 2012) o alrededor del nervio óptico (Delbeke et al., 2003). Alternativamente, distintos tipos de prótesis eléctricas podrían ser también utilizados para sustituir los fotorreceptores perdidos; de hecho, varios de estos implantes están siendo probados en ensayos clínicos (Ahuja et al., 2011; Zrenner et al., 2011).

Otros estudios trabajan sobre el desarrollo in vitro (cultivos 3D) de neurorretinas a partir de células madre embrionarias y terapias de trasplante (Assawachananont et al., 2014; Tanaka et al., 2015). Todas estas estrategias han demostrado eficacia en la generación de sensaciones visuales inducidas por estimulación mecánica, eléctrica o magnética en aquellos pacientes implantados con estas prótesis (Ho et al., 2015). La aplicación clínica de los implantes electrónicos tan sólo parece posible cuando la ceguera en los pacientes es casi completa, debido a que los graves efectos adversos de estos procedimientos (por ejemplo, traumatismos, inflamación, y la interferencia óptica) pueden acelerar la pérdida de la visión.

1.3.5.3 Neuroprotección

Aunque actualmente se están desarrollando prometedoras terapias génicas y regenerativas con células madre (Reynolds and Lamba, 2014; Solinís et al., 2015), estas terapias plantean soluciones a largo plazo. Sin embargo, existe la necesidad de proponer soluciones más inmediatas que permitan retrasar la progresión de la enfermedad.

La neuroprotección es otra estrategia terapéutica independiente de la mutación en la que el objetivo es preservar la viabilidad de las células afectadas, ya sea favoreciendo los mecanismos de supervivencia o bloqueando la muerte celular, proporcionando un entorno adecuado en el que prolongar la viabilidad de las células de la retina.

A diferencia de las terapias adaptadas específicas de genes o mutaciones, las ventajas de las estrategias neuroprotectoras son que no dependen de ninguna mutación específica y pueden proporcionar una ventana de tiempo más larga para el tratamiento (Trifunovic et al., 2012), por lo que este tipo de tratamientos es útil para intentar proteger de la muerte celular tanto a los bastones (portadores de la mutación) como a los conos, que degeneran secundariamente de forma independiente a la mutación. Otra ventaja de la neuroprotección es que permite tratar a un mayor número de pacientes que la terapia génica, ya que en la actualidad se desconoce la mutación genética responsable de la enfermedad en aproximadamente el 50% de los pacientes con RP (Chizzolini et al., 2011).

Además, muchos de los pacientes con retinosis pigmentaria buscan ayuda clínica cuando la degeneración de los fotorreceptores ha progresado considerablemente y la ceguera nocturna es ya importante. En esta etapa, los bastones han muerto en gran medida, lo que implica que muchas de las células que albergan el defecto genético original ya no están disponibles para la terapia génica.

El uso de fármacos es una estrategia ampliamente utilizada tanto en modelos animales como en humanos (Musarella and Macdonald, 2011). En este sentido, en la RP algunas posibilidades son la utilización de ciertos componentes o sustancias capaces de disminuir la muerte celular (Doonan and Cotter, 2004; Nakazawa, 2011), mejorar el estado antioxidante de la retina (Komeima et al., 2006; Umapathy et al., 2013), mejorar la supervivencia de los fotorreceptores con la administración de factores neurotróficos (Lipinski et al., 2011; Xia et al., 2011), etc. Entre los tratamientos farmacológicos más estudiados destacamos:

- La **vitamina A**, cuyo empleo ha dado buenos resultados en modelos animales (Li and Turner, 1998) y en ensayos clínicos (Berson, 1993). Se ha sugerido la terapia con vitamina A durante más de veinte años como una forma posible de ralentizar el proceso degenerativo de la retina (Berson, 1982) porque la deficiencia de vitamina A dificulta la síntesis de RHO ya que esta es un derivado de la primera, y, por lo tanto, puede ocasionar ceguera nocturna y un cuadro clínico similar a la RP. Por esta razón, se ha propuesto desde hace muchos años el tratamiento con vitamina A de los pacientes con RP para

retrasar los efectos degenerativos de la enfermedad. En diversos ensayos clínicos se ha demostrado que la vitamina A, junto con la taurina y la vitamina E mejoraron, o al menos retrasaron, la pérdida visual en los pacientes con retinosis pigmentaria (Pasantes-Morales et al., 2002). Otros estudios combinan la suplementación de vitamina A con el ácido docosahexanoico (DHA) para retrasar la muerte de los fotorreceptores (Berson et al., 2004), pero este efecto beneficioso no duró más de dos años. Sin embargo, la administración de vitamina A en pacientes de degeneraciones retinianas como la RP requiere de supervisión médica, debido a que tiene riesgo potencial de efectos indeseables (Penniston and Tanumihardjo, 2006). Como resultado, se puede producir incluso la muerte (Kapil, 2009). Así, se han descrito numerosos casos de intoxicación aguda por vitamina A que incluyen la aparición de signos y síntomas como: náuseas, vómitos, diarrea, falta de apetito, fatiga, fiebre, dolor de cabeza por edema cerebral, por citar algunos pocos (Allen and Haskell, 2002; Lam et al., 2006). Además, aparecen en la lista algunas disfunciones nerviosas, como por ejemplo confusión, irritabilidad, ansiedad, depresión e ideación suicida (Snodgrass, 1992). Pero los efectos indeseables se observan con mucha mayor frecuencia después de la ingesta de vitamina A de forma crónica. Los adultos que han tomado dosis elevadas de vitamina A clínicamente pueden presentar alteraciones en la piel (cambio de color, picor, eritema, descamación, *rash* cutáneo e incluso ulceración), caída del cabello, visión doble o borrosa, nistagmus, papiledema por pseudotumor cerebral, hematuria por disfunción renal, hepatoesplenomegalia, anemia aplásica, fatiga crónica, insomnio, parestesias, convulsiones y en ocasiones comportamiento psicótico además de alteraciones óseas o de las articulaciones (Rutkowski and Grzegorzczuk, 2012). Entre los riesgos asociados a la ingesta también se encuentran la disminución de la densidad ósea (osteoporosis) y la aparición de fracturas óseas con mayor frecuencia y a edades más tempranas en adultos que tomaban exceso de vitamina A (Penniston and Tanumihardjo, 2006) y la toxicidad hepática,

especialmente en pacientes con enfermedades hepáticas previas como la hepatitis vírica o los pacientes que toman medicamentos que se eliminan por vía hepática de forma crónica (Geubel et al., 1991). Así, deberíamos tener especial cuidado en pacientes diagnosticados además de una RP, de trastornos neuronales, como podría suceder en algunas formas de RP sindrómicas (Oliveira, 2015).

- El **ácido valproico**, cuyo tratamiento oral con una dosis que varió de 500 a 750 mg/día. Los posibles efectos del ácido valproico sobre los pacientes con retinosis pigmentaria muestran una mejora en el campo visual (Clemson et al., 2011; Bhalla et al., 2013) y en la agudeza visual (Kumar et al., 2014).
- La **unoprostona isopropilo** tópico. Se identificaron dos estudios que evaluaban el efecto de la unoprostona isopropilo tópico (0,12% dos veces al día), medicación utilizada como hipotensor ocular, en pacientes con RP (Tawada et al., 2013; Akiyama et al., 2014). El uso de la unoprostona isopropilo tópico parece que mejora la sensibilidad macular en torno a 2º y 10º en pacientes con la enfermedad.
- La **nivaldipina** oral. En varios estudios, el tratamiento a largo plazo con nivaldipina parece tener un efecto protector sobre la progresión del defecto en el campo visual central en pacientes con retinosis pigmentaria (Nakazawa et al., 2011; Nakazawa et al., 2013).
- Los **factores de crecimiento**, cuyo uso persigue evitar la muerte celular asociada a la neurodegeneración retiniana. Por ejemplo, se ha demostrado que el factor neurotrófico ciliar (CNTF) retarda la degeneración de la retina (Lenzi et al., 2005; Birch et al., 2013). Otros factores como el BDNF pueden enlentecer la progresión de la muerte celular de los fotorreceptores (LaVail et al., 1998).

La figura 24 muestra las diferentes estrategias para el tratamiento de la RP.

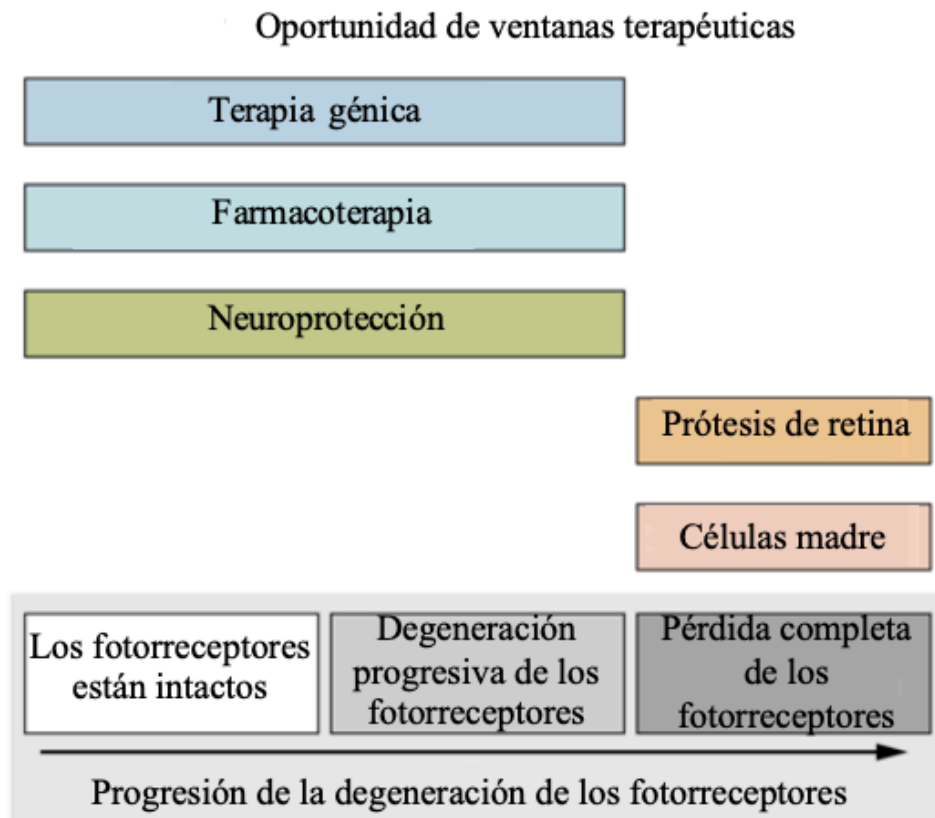


Figura 24. Diferentes estrategias para tratar la degeneración de la retina. Adaptado de Cideciyan et al., 2013.

1.3.6 Estrés oxidativo y retinosis pigmentaria

Tal y como se ha comentado en apartados anteriores, el estrés oxidativo se define como un desequilibrio entre la producción de EROs y los sistemas antioxidantes existentes en las células (Betteridge, 2000).

La retina es el tejido neurosensorial del ojo y es extremadamente rica en membranas con lípidos poliinsaturados (Panfoli et al., 2012). Esta característica la hace especialmente sensible al estrés oxidativo provocado por los radicales libres oxigenados (riesgo de peroxidación lipídica), siendo un blanco perfecto para las EROs (De La Paz and Anderson, 1992).

1.3.6.1 Daño oxidativo en la retinosis pigmentaria

Los bastones, además de ser más numerosos que los conos, son células metabólicamente muy activas con un elevado consumo de oxígeno. Durante la progresión de la RP, cuando los bastones mueren como consecuencia de una mutación genética, el consumo de oxígeno en la retina disminuye y se produce una situación de hiperoxia que originaría daño oxidativo. Este daño afectaría a la supervivencia de las células de la retina, entre ellas los conos, que sufren un daño oxidativo progresivo, y además exacerbaría la muerte de los bastones. La muerte de los conos en la RP se ha explicado tradicionalmente por varias hipótesis. Una de ellas es la hipótesis oxidativa de la retinosis pigmentaria. El estrés oxidativo se ha implicado en la patogénesis de la RP (Sanvicens et al., 2004; Komeima et al., 2007).

Los elevados niveles de oxígeno favorecerían la acumulación de radicales O_2^- que, junto con otras EROs y especies reactivas del nitrógeno (RNS), causarían importantes daños a los lípidos, a las proteínas y al ADN (Usui et al., 2011). A este fenómeno se le conoce como hipótesis de la toxicidad por el oxígeno en la retinosis pigmentaria.

De este modo, el estrés oxidativo se ha relacionado con la patogénesis de la RP, existiendo estudios que demuestran que el estrés oxidativo también se ha asociado con la muerte de los conos (Shen et al., 2005), ya que, tras la muerte de los bastones por mutaciones genéticas, la hiperoxia generada causaba peroxidación lipídica y daño oxidativo a proteínas y ADN que afectaba a la supervivencia de los conos. En este contexto, es cada vez más evidente que el estado redox de las células desempeñan un papel fundamental en la lucha contra el estrés oxidativo (Cai et al., 2000).

En las ratas P23H, un modelo de mutación autosómica dominante de retinosis pigmentaria se ha demostrado que la muerte de los fotorreceptores inducida por la hiperoxia incrementaba el estrés oxidativo en la retina y aceleraba la muerte de los fotorreceptores supervivientes (Yu et al., 2000; Yu et al., 2004). Estos estudios apoyan la hipótesis oxidativa de la RP sugiriendo que los marcadores de estrés oxidativo, así como las enzimas antioxidantes, pueden ser importantes dianas terapéuticas.

En la RP, la muerte de los conos ha supuesto durante mucho tiempo una paradoja, ya que la mayoría de los genes causantes de la enfermedad se expresan de manera selectiva en los bastones (Huang et al., 1995). Como se ha comentado previamente, los conos son los responsables de las funciones visuales más importantes, por lo que el conocimiento de los mecanismos que desencadenan su degeneración es fundamental y podría suponer el descubrimiento de nuevas e importantes dianas terapéuticas. Además, estas nuevas terapias se podrían aplicar a una gran variedad de mutaciones y podrían beneficiar a un mayor número de pacientes que la terapia génica. Otra ventaja de las terapias cuyo objetivo fuera retrasar la muerte de los conos es que podrían administrarse incluso en fases muy avanzadas de la enfermedad, ya que se ha demostrado que incluso cuando se han perdido el 95% de los conos, el residuo visual es substancial. Se ha sugerido que, si lográramos mantener los conos de los pacientes con retinosis pigmentaria funcionales y vivos, se evitaría la ceguera en más de 1.500.000 personas (Wright, 1997).

En cuanto al glutamato, es de los aminoácidos más abundantes en el cerebro y en la retina (Pasantes-Morales et al., 1972), y ha recibido la atención recientemente ya que los niveles altos tienen efectos tóxicos que deterioran la retina (Miyamoto and Del Monte, 1994).

1.3.6.2 Terapias antioxidantes en el tratamiento de la retinosis pigmentaria

La terapia con antioxidantes se ha sugerido como una forma posible de ralentizar el proceso degenerativo de la retina (Berson, 1982; Drack et al., 2012). El empleo de antioxidantes ha ido ganando importancia con el tiempo como una alternativa a considerar en el tratamiento de la RP. Han sido varios los compuestos que se han estudiado como posibles candidatos para una terapia con antioxidantes en la retinosis pigmentaria. Entre los más importantes destacan:

- La **curcumina** es un polifenol procedente de la cúrcuma con propiedades antioxidantes y antiinflamatorias. La administración de curcumina mejora la morfología de la retina en el modelo de rata P23H (Vasireddy et al., 2011).

- El **ácido tauroursodeoxicólico (TUDCA)** es un compuesto que tiene propiedades antioxidantes y protectoras (Gaspar et al., 2013), ya que preserva la función de los fotorreceptores en el ratón rd10 (Phillips et al., 2008; Oveson et al., 2011) y disminuye el estrés oxidativo en el modelo de rata P23H (Fernandez-Sanchez et al., 2011; Mantopoulos et al., 2011).
- La **N-acetilcisteína**, un derivado de la cisteína con propiedades antioxidantes que se emplea porque reduce la muerte de los bastones y preserva su función en el modelo de ratón rd1 (Lee et al., 2011) y rd10 (Yoshida et al., 2013).
- En pacientes con RP se han probado compuestos como la **luteína** (Berson et al., 2010), que ha mostrado dar buenos resultados en su empleo en ensayos clínicos
- La **nilvadipina**, antagonista de los canales de Ca^{+2} (Nakazawa et al., 2011) o el ácido clorogénico (Shin and Yu, 2014) que parecen tener efectos beneficiosos al retrasar la pérdida de campo visual en pacientes con retinosis pigmentaria.
- También se está estudiando el efecto de la administración del **ácido docosahexanoico (DHA)** aunque, por ahora, no parece mejorar el estado antioxidante de la RP (Hughbanks-Wheaton et al., 2014) y la mejoría en la AV no muestra un beneficio clínico significativo (Rayapudi et al., 2013).
- En ratones rd1, nuestro grupo de investigación ha demostrado que la combinación de antioxidantes como **zeaxantina** y **ácido alfa-lipoico**, fueron capaces de disminuir la tasa de muerte de los fotorreceptores (Sanz et al., 2007).

Los antioxidantes tienen la importante ventaja de que se consideran generalmente seguros para su uso en seres humanos adultos (Sibulesky et al., 1999), pudiendo mejorar la visión de manera, por lo menos, transitoria, aunque es poco probable que revierta la degeneración completamente. Estos estudios apoyan la hipótesis de la toxicidad por el O_2 de la retinosis pigmentaria, sugiriendo que los marcadores de estrés oxidativo, así como las enzimas antioxidantes, pueden ser importantes dianas terapéuticas para la terapia neuroprotectora en la RP.

1.3.7 Tiorredoxina y retinosis pigmentaria

La muerte de los fotorreceptores en la RP también se debe a que los bastones liberan un factor tráfico difusible que promueve la supervivencia de los conos y que son necesarios para la supervivencia de los conos (Mohand-Said et al., 1998), y que cuando los bastones mueren dicho factor se pierde. El factor de neuroprotección se llama factor derivado de la viabilidad de los conos derivado de bastones (RdCVF, de las siglas en inglés *Rod-derived Cone Viability Factor*) y existen estudios que demuestran que su administración rescata a los conos, (Yang et al., 2009), siendo un candidato para el tratamiento de la RP. Este factor es clave en la conservación de la viabilidad de los conos, que los protege de la muerte (Scholl et al., 2016). Levéillard et al identificaron este factor en 2004 (Léveillard et al., 2004). Este factor se trata de una proteína tipo TRX truncada específicamente expresada por los fotorreceptores, que permite la viabilidad de los conos y retrasaría su muerte secundaria tras la muerte de los bastones (Léveillard and Sahel, 2010; Sahel et al., 2013; Elachouri et al., 2015). El RdCVF está codificado por el gen nucleoredoxin-like también conocido como NXNL1 (figura 25). NXNL1 codifica para dos proteínas, una es el RdCVF que es una TRX truncada y que no tiene actividad enzimática TRX (Chalmel et al., 2007). Además, el procesamiento alternativo del gen resulta en una proteína con actividad TRX conocida como RdCVFL (de las siglas en inglés *Thioredoxin-Like protein Rod-derived Cone Viability Factor*). RdCVFL tiene un importante papel protector de los fotorreceptores en situaciones de estrés oxidativo.

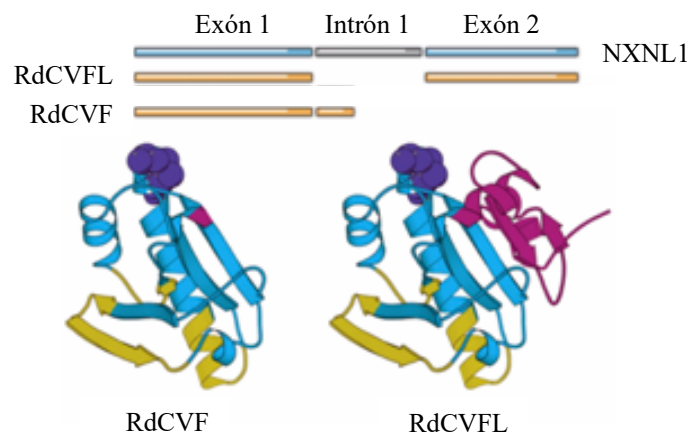


Figura 25. Representación del gen nucleoredoxin-like y sus dos productos. Aït-Ali N, et al., 2015.

Se ha demostrado que RdCVF, que no tiene actividad TRX, actúa a través de su unión a Basigin-1 (BSG-1), una proteína transmembrana expresada específicamente por los fotorreceptores. Así, BSG-1 se une al transportador de glucosa GLUT1, facilitando la entrada de glucosa dentro de los conos. Este mayor aporte de glucosa facilita la supervivencia de los conos a través de la estimulación de la glucólisis anaerobia (Holmgren, 1985). Estos resultados concuerdan con otros trabajos previos en los que se había observado que la insulina u otros factores similares mejoraban la supervivencia de los conos en distintos modelos animales de retinosis pigmentaria (Arroba et al., 2011), llegando a sugerir que los conos mueren por situación de ayuno y falta de glucosa a la que están sometidos.

La tiorredoxina humana se clonó como un factor soluble denominado factor derivado de la leucemia de células T adultas, que se purificó como un factor de crecimiento secretado por líneas celulares leucémicas a partir del medio condicionado de la línea de células T CD4 transformadas por el virus linfotrópico T humano, ATL-2 (Tagaya et al., 1989; Yodoi and Uchiyama, 1992). La familia de las TRX incluye a más de 10 proteínas que catalizan la reducción de las uniones disulfuro de un elevado número de proteínas, que una vez oxidadas se pueden reducir de forma reversible por la acción de la TRX reductasa (TRXR) y NADPH (Holmgren, 1989). La TRX actúa como un gran antioxidante al reducir o “secuestrar” EROs (Mitsui et al., 1992) y juegan un importante papel en el mantenimiento de un entorno reducido en la célula (Nadeau et al., 2009), que además modula la inflamación y podría tener efectos beneficiosos sobre la activación de la microglía. Nuestro grupo de investigación también ha demostrado la importancia del metabolismo de los tioles en la RP (Miranda et al., 2010).

La TRX es una proteína redox de tan sólo 12 kDa expresada de forma ubicua en todas las células vivas y tiene una variedad de funciones biológicas relacionadas con la proliferación celular y la muerte celular (Eklund et al., 1991). Se caracteriza por la secuencia de sitios activos de reducción / oxidación (redox) Trp-Cys-Gly-Pro-Cys-Lys, siendo una de las moléculas más importantes que controlan el sistema de regulación redox (Yoshihara et al., 2014). El sitio activo de la TRX consiste en los dos residuos de cisteína dentro del centro activo redox, que proporcionan los grupos sulfhidrilo involucrados en la actividad reductora dependiente de TRX.

Este motivo estructural (Cys-Gly-Pro-Cys) altamente conservado puede ciclar entre una forma activa del ditiol reducida y la forma oxidada del disulfuro (Takagi et al., 1998; Poole et al., 2000). En su estado activo, la TRX actúa reduciendo y eliminando las EROs y manteniendo otras proteínas en su estado reducido (Arner and Holmgren, 2000). La forma oxidada (TRX-S₂) contiene un puente disulfuro en el sitio activo que se reduce a un ditiol por NADPH y la flavoproteína TRX reductasa (TRXR). Es decir, que cuando la TRX es oxidada, la TRXR se encarga de regenerarla usando NADPH como donante de electrones (Holmgren, 1985). Por lo tanto, el sistema TRX está compuesto de TRX, TRXR y NADPH in vivo (Buchanan et al., 1994; Nadeau et al., 2009). Además, protege contra la citotoxicidad inducida por el H₂O₂ y TNF- α (Matsuda et al., 1991).

En mamíferos existen dos isoformas de TRX: TRX1, presente en el citoplasma y en el núcleo y codificada por el gen TXN; y la TRX2, presente en las mitocondrias y codificada por el gen TXN2 (Nakamura H et al., 1994).

En cuanto a la TRXR, en las células humanas, tres genes la codifican: TXNRD1, TXNRD2, y TXNRD3. La enzima TRXR1, codificada por el gen TXNRD1, se encuentra en el citosol. El gen TXNRD2 codifica la proteína mitocondrial TRXR2 que reduce a la TRX2 (Miranda-Vizuet et al., 1999). Aunque esta reductasa también se encuentra en el citosol, parece que su nivel de expresión es más bajo en comparación con TRXR1 (Turanov et al., 2006). TRXR1 y TRXR2 son selenoproteínas oxidorreductasas homodiméricas que contienen un motivo estructural Gly-Cys-Selenocisteína-Gly en su extremo C-terminal, donde tiene lugar la reducción de la TRX (Zhong and Holmgren, 2002). La TRXR3 es similar a la TRXR1 y TRXR2, pero contiene además un dominio glutarredoxina monotiol en el extremo N-terminal que permite modular su función (Su et al., 2005).

Además, se sabe que un incremento en el estrés oxidativo modifica la actividad de la TRXR iniciando una cascada de señales en respuesta a los radicales libres en el citoplasma que provoca cambios en el estado de oxidación de las cisteínas de la TRX. Puesto que la retina tiene la mayor tasa metabólica por peso en el cuerpo (Yu et al., 2005) y está constantemente expuesta a EROs, el sistema de regulación redox es particularmente importante para la supervivencia de la retina, por lo que la administración exógena de TRX puede ser muy útil.

1.3.8 Factores de crecimiento y retinosis pigmentaria

El papel de los factores de crecimiento en la RP es desconocido, aunque alguno de ellos se ha ensayado como forma de tratamiento en la retinosis pigmentaria.

Entre las sustancias que se han utilizado como tratamientos neuroprotectores en la RP se encuentran distintos factores de crecimiento, como:

- El **FGF** es un posible candidato (Uteza et al., 1999; Neuner-Jehle et al., 2000). Se ha demostrado que las inyecciones de FGF (Green et al., 2001), por ejemplo, contrarrestan la degeneración en la rata RCS (Faktorovich et al., 1990).
- **PEDF**, ya que su receptor se encuentra en el segmento interno de los fotorreceptores y en la capa de células ganglionares (Aymerich et al., 2001; Miyazaki et al., 2008). Incluso, es posible una sinergia junto con el FGF, que mejora la protección contra el daño a los fotorreceptores (Cao et al., 2001).
- Se ha demostrado que el **CNTF** es efectivo para frenar la degeneración de la retina en modelos animales de RP (Cayouette et al., 1998).
- **IGF**, que atenúa la muerte celular inducida por la apertura constante de los canales de Ca^{+2} (Arroba et al., 2009).
- **VEGF**. Se identificó inicialmente como un factor de permeabilidad vascular y recientemente se ha demostrado que influye en el crecimiento y supervivencia neuronales (Sondell et al., 1999; Jin et al., 2000). Una de las características clínicas más llamativas de la RP es el adelgazamiento de los vasos sanguíneos retinianos, alteraciones que en su progresión conduce, en estadios avanzados al desarrollo de degeneraciones fibróticas e incluso a la desaparición de los vasos sanguíneos retinianos, por lo que se ha demostrado la disminución del VEGF en suero de pacientes con RP (Salom et al., 2008). Este hallazgo clínico constituye la piedra angular sobre la que gravita la implicación del VEGF en la retinosis pigmentaria. Por eso, comprender el papel del VEGF en la patogénesis de la RP puede ayudar a la investigación en los tratamientos neuroprotectores para la RP.

- **HGF**, cuyos efectos incluyen la regulación del desarrollo y supervivencia de muchos tipos celulares (Russell et al., 1984; Nakamura et al., 1989). En el ojo, el HGF juega un gran papel en la angiogénesis ocular y en la neuroprotección de las neuronas retinianas (Bussolino et al., 1992; Salom et al., 2010). El efecto antiapoptótico puede ser el mecanismo de acción neuroprotector del HGF, que se sabe que es uno de los mecanismos de muerte de los fotorreceptores en los modelos animales de RP (Shahinfar et al., 1991; Tso et al., 1994).

1.3.9 Modelos animales en la retinosis pigmentaria

El genoma del ratón está completamente secuenciado. Es un 85% homólogo al genoma humano (Waterston et al., 2002), y se puede manipular fácilmente, lo que lo convierte en un modelo apto para los estudios de las degeneraciones retinianas (Keeler, 1966; Shearstone et al. 2005). El desarrollo de nuevas estrategias para el tratamiento de la RP requiere el uso de modelos adecuados. Varios modelos animales para la retinosis pigmentaria son estudiados en la actualidad (Hafezi et al., 2000).

Uno de los modelos animales más estudiados en la RP es el ratón rd1 (Pittler et al., 1993). El ratón rd1 (o "*rd*" "*retinal degeneration*"), que fue descrito por vez primera por Keeler en el año 1924 (Keeler, 1924; Keeler, 1926), tiene una rápida degeneración de los fotorreceptores. El trastorno en este modelo animal es causado por una mutación en el gen autosómico recesivo que provoca la degeneración de la retina (Sidman and Green, 1965). Este gen codifica para la subunidad beta de la fosfodiesterasa-6 (PDE6) de los bastones (Lolley et al., 1980; Bowes et al., 1990), lo que provoca la no expresión de la proteína cGMP fosfodiesterasa-6 (Yan et al., 1998) y la acumulación de GMPc. Esta acumulación hace que los canales de calcio generen un flujo de entrada anormal (Gregory and Bird, 1995; Fox et al., 2003). Esto puede ser el desencadenante de una cascada de eventos aún desconocida que finalmente conduce a la muerte de las células fotorreceptoras (Adler, 1996; Travis et al., 1998).

Esta mutación se localiza en el cromosoma 5 del gen que codifica para la PDE6 β . Su aparición es debida a la inserción de un virus murino que introdujo una mutación sin sentido en el exón 7 del gen (Pittler and Baehr, 1991; Bowes et al., 1993). Todo ello produciría la degeneración de bastones a un ritmo relativamente rápido (Hauck et al., 2006), seguido por la muerte secundaria de los conos de forma independiente a la mutación.

El defecto genético provocado por la mutación de la PDE6 β también puede ser el responsable de la retinosis pigmentaria en los seres humanos, siendo relacionados con los casos de RP autosómica recesiva (Bowes et al., 1990; McLaughlin et al., 1993). En concreto, las mutaciones que afectan a la función de la PDE6 son responsables de un 10% de las RP en pacientes humanos (Bayés et al., 1995; Dryja et al., 1999), haciendo del ratón rd1 un modelo pertinente para el estudio de la enfermedad.

Es bien sabido que la mutación en el modelo animal rd1 da como resultado una acumulación de cGMP en los fotorreceptores (Farber et al., 1994). Dicha acumulación de cGMP induce una despolarización continua, manteniendo abiertos sus canales catiónicos activados por cGMP. La posterior activación de los canales de Ca⁺² sensibles al voltaje podría desencadenar una liberación prolongada del transmisor de glutamato, un aminoácido excitador crítico en el cerebro y el aminoácido excitador más importante en la retina.

1.4 Miopía

La miopía es el trastorno ocular más común (Young, 2009) y representa un problema creciente de salud en muchas partes del mundo (Iwase et al., 2006; Morgan et al., 2012), particularmente en las poblaciones asiáticas (Lam et al., 2004; Han et al., 2006), y se ha convertido en un problema de salud pública en la sociedad moderna (Zhao et al., 2000), que causa una gran carga económica (Rein et al., 2006; Foster and Jiang, 2014).

Por un lado, es un problema óptico de desenfoque, que se debe a un desajuste entre la longitud axial (LA) del globo ocular (la principal característica anatómica) (Atchison et al., 2004) y las lentes que lo componen (la córnea y el cristalino), que se caracteriza por una mala visión de los objetos lejanos.

Por otro lado, es también un problema médico sin resolver que predispone a la persona que la padece a sufrir con mayor frecuencia otras patologías oculares, tales como desprendimientos de retina (Mattioli et al., 2009), cataratas (Lim et al., 1999; Saw et al., 2005), hemorragias y agujeros maculares (Lavers and Zambarakji, 2013) y glaucoma (Fong et al., 1990; Chang and Singh, 2013), ya que la elevada LA parece influir en los defectos de la capa de fibras nerviosas, lo que conduce a una mayor susceptibilidad a daño glaucomatoso. La miopía puede llegar incluso a provocar la ceguera (Seet et al., 2001), siendo una amenaza grave para la calidad de vida (Verkicarla et al., 2015).

1.4.1 Remodelación del globo ocular

La visión clara y nítida requiere un sistema óptico que enfoque correctamente las imágenes de los objetos en el tejido sensorial del ojo, la retina. Esto se logra a través de una coordinación precisa de los componentes refractivos para alinear el punto focal del ojo con el plano retiniano. Cualquier desviación de la coincidencia entre el punto focal y la retina causará visión borrosa. La miopía se produce cuando los objetos distantes se enfocan en un punto anterior a la retina, tal y como muestra la figura 26.

Los modelos de miopía experimental y los datos epidemiológicos han demostrado que el desarrollo y el progreso de la miopía es el resultado de un alargamiento desproporcionado de la esclerótica en el segmento posterior del ojo (Curtin and Teng, 1958; Avetisov et al., 1983), lo que da como resultado la remodelación de la matriz extracelular de la esclerótica (Harper and Summers, 2015; Metlapally and Wildsoet, 2015), la disfunción de las células del epitelio pigmentario retiniano (Zhang and Wildsoet, 2015), etc. Los principales cambios metabólicos en este proceso incluyen la reducción de la síntesis de colágeno y el aumento de su degradación, la reducción de la síntesis de glicosaminoglicanos y la expresión alterada de la integrin

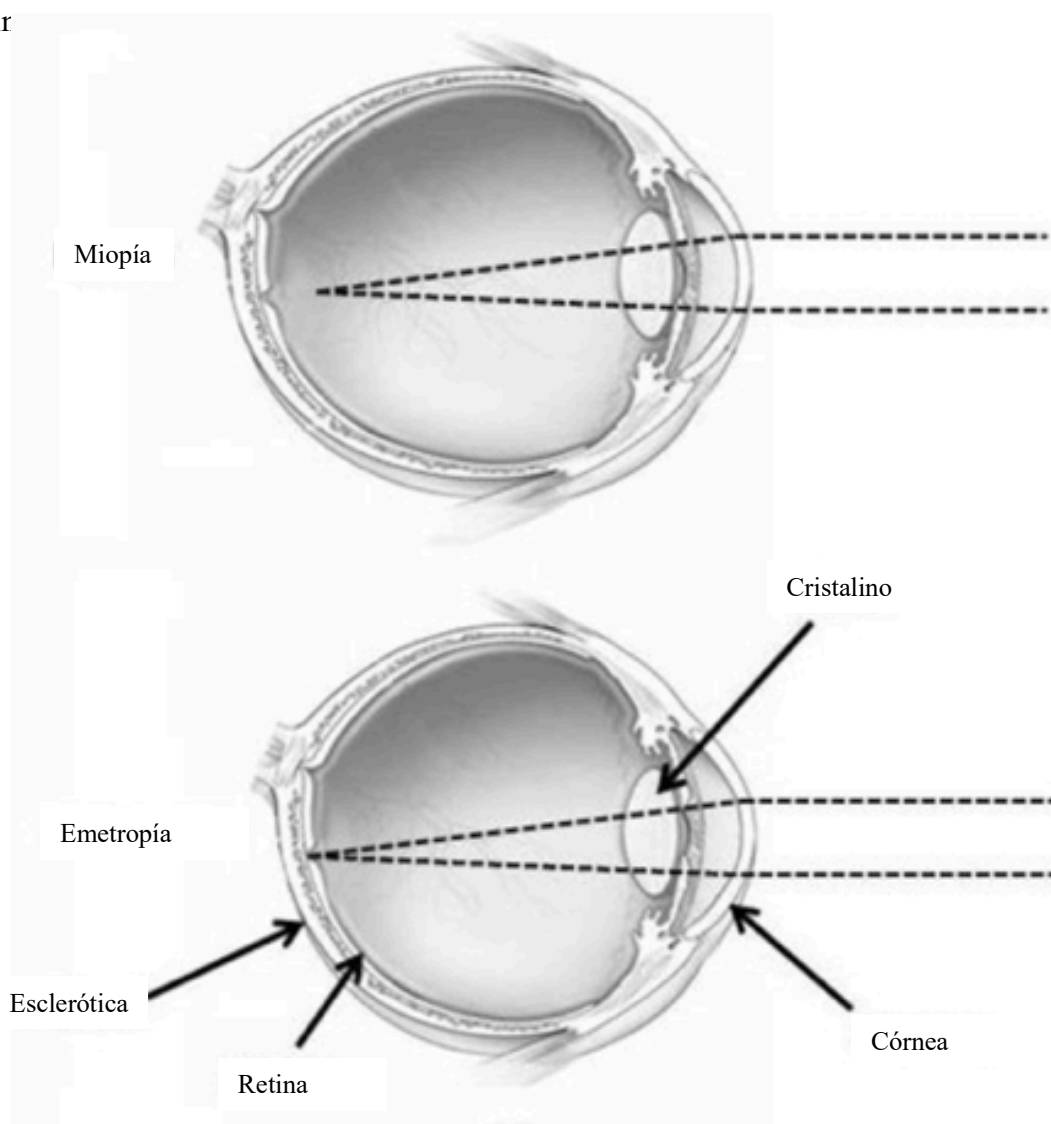


Figura 26. Base anatómica de los errores refractados de la miopía. En la miopía, los rayos de luz paralelos provenientes de los objetos se enfocan frente a la retina, lo que causa visión borrosa a distancia. En la emetropía, la luz incidente de los objetos distantes se enfoca en la retina. Adaptado de Wojciechowski, 2011.

Los ojos miópicos son estructuralmente diferentes que los ojos emétopes, ya que tienen longitudes axiales más largas (Scott and Grosvenor, 1993). Este alargamiento axial que acompaña a la miopía produce un adelgazamiento de la retina (Wakitani et al., 2003; Logan et al., 2004), uno de los motivos por los que la miopía, mayoritariamente la patológica, aumenta el riesgo de sufrir otras patologías oculares, lo que puede alterar el rendimiento visual (Subbaram and Bullimore, 2002; Chui et al., 2005) y, con el tiempo, causar una pérdida de visión irreversible (Wong et al., 2014). Por ejemplo, en los ojos altos miopes, el aumento de la LA se correlaciona con la disminución del grosor escleral entre otros (Yang et al., 2015). Las discapacidades visuales asociadas a la miopía se deben principalmente a lesiones retinianas y coroideas (Hayashi et al., 2010), ya que la coroides es la estructura vascular que se encarga de proveer nutrientes y eliminar desechos metabólicos del EPR, modular la vascularización y el crecimiento escleral y mantener la función visual normal (Nickla and Walman, 2010).

1.4.2 Sintomatología de la miopía

Los miopes notan, generalmente, que no reconocen los rostros de personas y objetos que están lejos, y los ven difuminados o borrosos. Sin embargo, los objetos cercanos los ven con total claridad.

Los síntomas típicos de la miopía son:

- Dolor de cabeza o fatiga visual.
- Mareos.
- Dificultad para concentrarse.
- Sequedad/picor permanente de los ojos.
- Necesidad de achicar los ojos para leer/ver algo lejano.

1.4.3 Epidemiología de la miopía

La miopía patológica es actualmente una causa importante de deficiencia visual en todo el mundo (Green et al., 1986). Su prevalencia varía según áreas geográficas, razas, grupos sociales y nivel sociocultural (Wong et al., 2000). La figura 27 muestra las estimaciones del número total de personas con miopía a nivel mundial (Holden et al., 2016). Esta gráfica representa que la miopía y la alta miopía mostrarán un aumento significativo en la prevalencia a nivel global, que afectará a casi cinco mil millones de personas y mil millones de personas, respectivamente, para el año 2050. Todo esto tendrá importantes implicaciones en cuanto a la prevención de las complicaciones oculares relacionadas con la miopía y la pérdida de la visión en personas con miopía alta.

En general, en muchas partes del mundo se ha visto un aumento dramático en la miopía, que actualmente afecta a alrededor de la mitad de los adultos jóvenes en los Estados Unidos y Europa, el doble de la prevalencia de hace medio siglo (Krumpaszky et al., 1999).

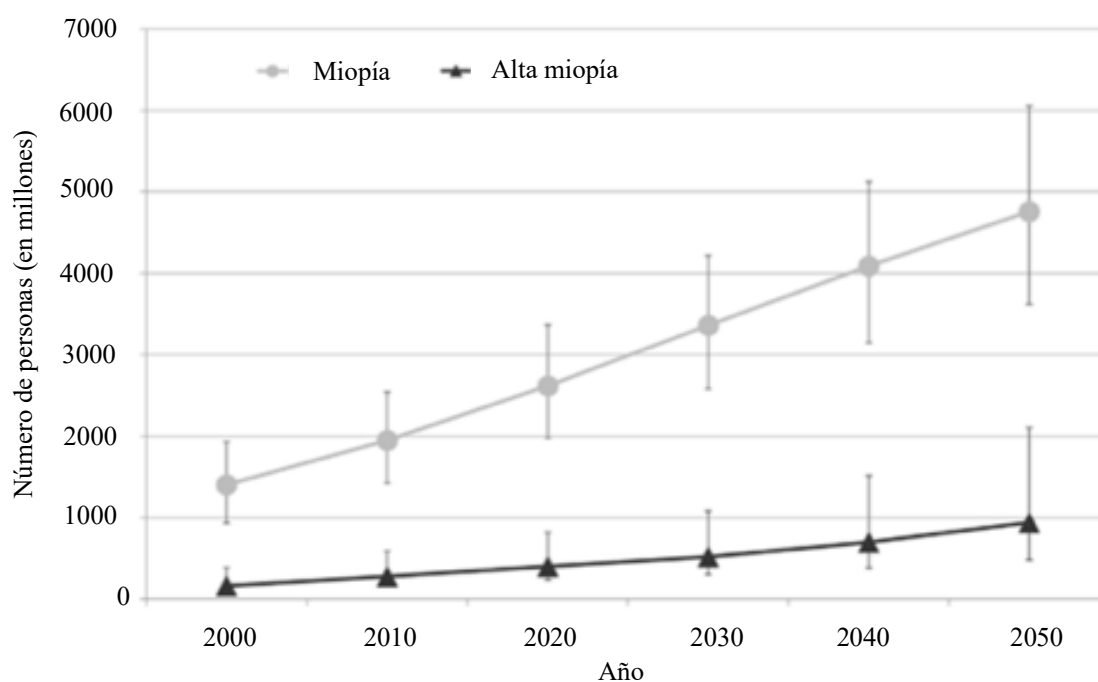


Figura 27. Gráfico que muestra el número de personas que se estima tienen miopía y alta miopía por cada década desde 2000 hasta 2050. Las barras de error representan los intervalos de confianza del 95%. Adaptado de Holden et al., 2016.

Los aumentos axiales proyectados en la miopía y la alta miopía son ampliamente impulsados por factores ambientales, principalmente cambios en el estilo de vida, que resultan de una combinación de un menor tiempo al aire libre y un aumento de las actividades laborales, entre otros factores. La predisposición genética sin duda parece desempeñar un papel en el desarrollo de la miopía, pero no puede explicar estas tendencias temporales observadas durante un corto período de tiempo (Lim et al., 2014). Entre los factores ambientales, los llamados sistemas educativos de alta presión, especialmente en edades muy tempranas en países como Singapur, Corea, Taiwán y China, pueden suponer un cambio en el estilo de vida, al igual que el uso excesivo de los dispositivos electrónicos. Otras causas propuestas para incidir en el desarrollo de la miopía incluyen los niveles de luz (Read et al., 2014), que pueden estar directamente relacionados con las horas pasadas al aire libre, y la dieta (Lim et al., 2010).

1.4.3.1 Según las áreas geográficas

En Europa occidental, la prevalencia descrita de la miopía es del 26,6% y está aumentando (Vongphanit et al., 2002), esperándose que alcance 2.500 millones para el año 2020 (Kempen et al., 2004).

Hay evidencia de que la prevalencia de la miopía ha aumentado en muchas zonas del mundo en las últimas décadas (Matsumara and Hirai, 1999; Bloom et al., 2010).



Dolgin, 2015.

En la década de los años 80, la prevalencia de la miopía era del 25% según los estudios que se realizaron en los Estados Unidos de América (Sperduto et al., 1983), y subiendo año tras año (Vitale et al., 2008). En Israel se reportó una prevalencia del 18,4% (Hyams et al., 1977).

En Asia, siempre se presume que la prevalencia de miopía es mucho más alta, alcanzando proporciones epidémicas en algunas zonas del continente asiático (Grosvenor, 2003; Kim et al., 2013). De hecho, la alta prevalencia de miopía se observó por primera vez en la década de los años 30 en China (Rasmussen, 1936). Por ejemplo, en Taiwán, por citar un caso concreto, existen numerosos estudios que muestran una prevalencia de más del 80% a los 18 años (Lin et al., 1988; Lin et al., 1999).

Otro estudio en una población de estudiantes japoneses mostró una prevalencia general de aproximadamente el 50% (Hosaka, 1988), y un estudio en Hong Kong en adultos chinos de 40 años o más mostró una prevalencia de aproximadamente el 40% (Van Newkirk, 1997; Fan et al., 2004). En Singapur (Koh et al., 2014), mostraron que la prevalencia en esta ciudad puede estar entre las más altas del mundo (Chew et al., 1988; Chow et al., 1990). Además, la prevalencia de la miopía en estos países asiáticos parece estar aumentando tal y como refleja la figura 28, y más dramáticamente entre las personas más jóvenes del este de Asia (Pan et al., 2015). De hecho, en Seúl (Corea del Sur), un 96,5% de los hombres de 19 años son miopes (Dolgin, 2015).

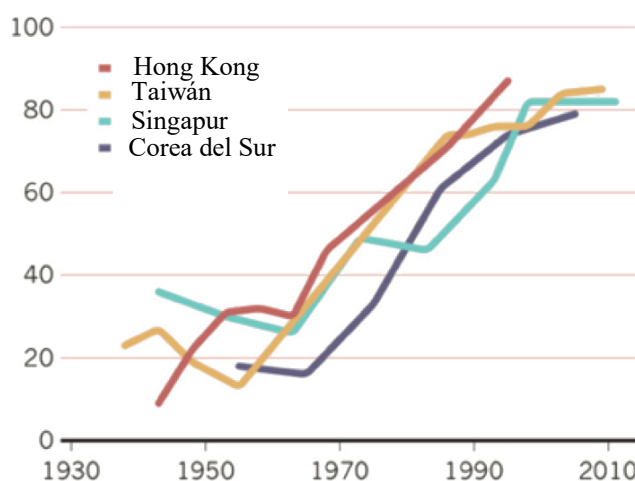


Figura 28. Gráfico que muestra el número de personas que tienen alta miopía por cada 20 años desde 1930.

Adaptado de Pan et al., 2015.

1.4.4 Factores ambientales y factores genéticos

En la miopía están implicados múltiples genes, numerosos factores ambientales y sus interacciones (Hysi et al., 2014; Zhang, 2015). Los factores implicados en la aparición, progresión y aparición de complicaciones asociadas a la miopía se pueden dividir en dos tipos: ambientales/socioculturales y genéticos (Angle et al., 1980).

1.4.4.1 Factores ambientales

Ramamurthy et al. han revisado la gran cantidad de factores de riesgo ambiental para la miopía (Ramamurthy et al., 2015). Entre las posibles razones ambientales sugeridas se incluye:

- Aumento en el grado de educación (Wensor et al., 1999; Shimizu et al., 2003), por la excesiva acomodación (Mutti, 2010). Desde hace algunas décadas hasta la fecha actual, muchos estudios han evidenciado una relación de la acomodación excesiva con la evolución de la miopía (Dunphy et al. 1968). Esta situación de un trabajo cercano sostenido a lo largo del tiempo conduciría a una contracción mantenida del músculo ciliar, impidiendo la correcta acomodación, a lo que el ojo responde erróneamente con un aumento en la tasa de crecimiento ocular.
- Estatus socioeconómico más alto (Wong et al., 2002).
- Más tiempo dedicado a tareas cercanas en el trabajo (Saw et al., 1996; Huang et al., 2015). El llamado "trabajo cercano" se ha definido y medido de muchas maneras en diferentes estudios (por ejemplo, en el nivel de educación, en la duración del tiempo de estudio continuo, en el tiempo dedicado a leer libros, en el número de libros leídos por semana, en la distancia de trabajo más cercana...) y es, por su naturaleza, difícil de cuantificar. No obstante, el aumento de la miopía refleja una tendencia mayor en los niños de aquellos países en los que pasan más tiempo dedicados a la lectura, el estudio o, más recientemente, a las pantallas de ordenadores y teléfonos. Por ejemplo, Saw et al. encontraron que los niños miopes en China pasaban más tiempo leyendo que los niños no miopes

(Saw et al., 2001). Otro estudio muestra que los niños con miopía pasaban más tiempo estudiando y leyendo y menos tiempo practicando deportes al aire libre que los niños no miopes (Mutti et al., 2002). Además, también se han observado altas prevalencias y tasas de progresión de la miopía en aquellos individuos con ocupaciones visualmente intensivas (Tokoro, 1988). Todo esto es, si cabe, más pronunciado en los países del este de Asia, donde el alto valor que se otorga al desempeño educativo hace que los niños pasen más tiempo en la escuela y en sus estudios. Un informe de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE) mostró que los niños de 15 años en Shanghái pasan 14 horas por semana realizando las tareas, en comparación con las 5 horas en el Reino Unido y las 6 horas en los Estados Unidos de América (Salinas, 2014). Sin embargo, los estudios sobre el efecto de la lectura en la progresión de la miopía han proporcionado resultados contradictorios. Mientras que existen estudios realizados en niños de Singapur en los que el trabajo cercano no se asoció con un empeoramiento de la miopía (Saw et al., 2000), otro estudio muestra que los niños finlandeses que pasaron más tiempo leyendo tuvieron tasas de progresión de miopía más alta (Pärssinen et al., 1989). Este tipo de estudios están sujetos a un tipo de error que puede sesgar los resultados, como, por ejemplo, las edades, las etnias o las circunstancias sociales de los sujetos del estudio. Además, el uso actual de las tecnologías tales como los móviles, las tablets, los ordenadores y otros dispositivos electrónicos, ha aumentado la complejidad a la pregunta del trabajo cercano (Simensen and Thorud, 1994; Zadnik et al., 2015). De hecho, se podría argumentar que el reciente aumento en la prevalencia de la miopía en Asia reflejado en numerosos estudios podría ayudarse también del aumento constante en el uso de dispositivos electrónicos en las últimas tres décadas. Sin embargo, aún no se ha establecido de manera convincente un vínculo directo entre la utilización de dispositivos electrónicos y el desarrollo de la miopía.

- Si bien la actividad cercana aumenta el riesgo de miopía, la participación en actividades al aire libre ha mostrado relaciones protectoras frente a la miopía (Wu et al., 2013; Wu et al., 2018). Se ha encontrado en muchos estudios que los niños que pasan menos tiempo en el exterior corrían más riesgo de desarrollar miopía (Rose et al., 2008; Dirani et al., 2009). Es decir, que la exposición del ojo a la luz natural tendría algún efecto. La hipótesis es que la luz estimula la liberación de dopamina en la retina, y este neurotransmisor bloquea el alargamiento del ojo durante el desarrollo. Existen estudios que demostraron que al inyectar en pollos espiperona, un inhibidor de la dopamina, se eliminaría el efecto protector de la luz brillante (Ashby and Schaeffel, 2010). La dopamina retiniana se produce en ciclo diurno, aumentando durante el día. Los investigadores sospechan que bajo iluminación tenue (típicamente en interiores), el ciclo se interrumpe, con las consecuencias para el crecimiento del ojo. "Si nuestro sistema no obtiene un ritmo diurno fuerte, las cosas se salen de control", dice Ashby, quien ahora se encuentra en la Universidad de Canberra.
- Otros estudios han enfatizado la importancia de diferenciar entre la vida urbana y la rural (Xu et al., 2006), ya que se encontraron diferencias en el desarrollo de la miopía entre estas dos poblaciones (Pan et al., 2012). Se ha descubierto que los niños de entornos urbanos tienen 2.6 veces más probabilidades de sufrir miopía que los de los entornos rurales (Rudnicka et al., 2016). Es probable que los factores mediadores de todos los efectos ambientales sean una combinación de educación, trabajo y tiempo pasado al aire libre.

Sin embargo, los intentos durante siglos para prevenir la progresión de la miopía a través de la influencia sobre los factores ambientales/socioculturales son discutibles en miopía normal y han fracasado en caso de la miopía magna (Fredrick. 2002). Además, existen estudios que muestran que comportamientos específicos, como los libros leídos por semana o las horas dedicadas a leer o usar el ordenador, no parecían ser un factor importante en el riesgo de miopía (Saw et al., 2002).

1.4.4.2 Factores genéticos

Si bien el comportamiento y el entorno desempeñan funciones importantes, no explican por sí solos la aparición y el desarrollo de la miopía, más que nada, porque las medidas en torno a las actitudes respecto a la lectura y demás no afectan al desarrollo de la miopía patológica o degenerativa y se ha demostrado que existe un patrón de herencia autosómica en los pacientes con miopía magna (Wu and Edwards, 1999). Durante muchos años, el consenso científico sostuvo que la miopía se debía principalmente a los genes.

Los estudios realizados en la década de los años 60, mostraron que la condición era más común entre los gemelos genéticamente idénticos que en los no idénticos, lo que sugiere que la susceptibilidad está fuertemente influenciada por el ADN. Es sabido que los hijos de padres miopes tienden a tener ojos más largos (Ip et al., 2007) y son más propensos a desarrollar miopía durante la infancia o la adolescencia (Goss and Jackson, 1996).

Existen numerosos factores funcionales que están relacionados positivamente con la miopía y se saben que están involucrados en el crecimiento de la esclera y de la matriz extracelular, como por ejemplo son:

- **Colagenasas**, que son unas metaloproteinasas de la matriz que rompen los enlaces peptídicos, degradando así los colágenos (Mutti et al., 2007; Metlapally et al., 2009).
- **TGFβ**. Se trata de un inhibidor del crecimiento ya que promueve la expresión de inhibidores del ciclo celular (Lin et al., 2006; Lin et al., 2009).
- **Factor de crecimiento de hepatocitos** (HGF, de las siglas en inglés *Hepatocyte Growth Factor*) (Yanovitch et al., 2009; Veerappan et al., 2010) y su receptor cMET (de las siglas en inglés *tyrosine-protein kinase MET*) (Khor et al., 2009).
- **IGF1** (Khor et al., 2010).
- **Metaloproteinas** de la matriz (Wojciechowski et al., 2010).

La evidencia a favor de un papel para la predisposición genética en el desarrollo refractivo es convincente. Varios estudios han identificado más de 25 genes supuestamente implicados en la refracción ocular de la miopía, respaldando la hipótesis de que existe una fuerte evidencia de que la base genética y los factores hereditarios (Wojciechowski, 2011) afectan al desarrollo y la progresión del error refractivo y a la evolución de la miopía magna, estando relacionados aquellos genes que afectan directamente al crecimiento de la esclera y del ojo.

Además, como era de esperar, la miopía de los padres se correlaciona con ciertos componentes oculares, en particular la longitud axial, lo que conlleva un gran riesgo genético (Pärssinen and Kauppinen, 2016). Sin embargo, el factor genético está lejos de responder completamente al problema de la miopía. Por ejemplo, hay grandes diferencias de prevalencia en miopía y en alta miopía en poblaciones similares. Los cambios genéticos suceden demasiado lentamente para explicar este rápido cambio en pocas décadas.

Estos dos tipos de factores, ambientales y genéticos, intervienen sin duda en el inicio y progresión de la miopía, pero actualmente estamos lejos de conocer los mecanismos moleculares que lo regulan y que, con el transcurrir de los años, conllevan en el paciente que padece alta miopía al grave deterioro retiniano que hacen del tratamiento de la AM, probablemente el primer asunto pendiente en la oftalmología actual.

1.4.5 Tipos de miopía

Existen fundamentalmente dos tipos de miopía con pronóstico bien distinto, aunque los límites entre ambas no están netamente definidos. El parámetro que más se correlaciona con ellos es la longitud axial (figura 29), reconociéndose como más adecuado fijar en 26 mm el límite entre ambas.

Tradicionalmente, por debajo de estos valores hablamos clásicamente de miopía simple o leve, un defecto óptico que puede compensarse con corrección óptica (gafas o lentes de contacto) o incluso con cirugía (corneal o intraocular).

Los pacientes con miopía simple presentan una LA del globo ocular inferior a 26 mm. Desde hace mucho tiempo se ha postulado que el inicio y la progresión de la miopía pueden estar relacionados con la acomodación y la convergencia (de Jong, 2018). Se ha observado una relación elevada de acomodación / convergencia / acomodación (ACA) antes del comienzo de la miopía (Gwiazda et al., 2005; Zadnik et al., 2015).

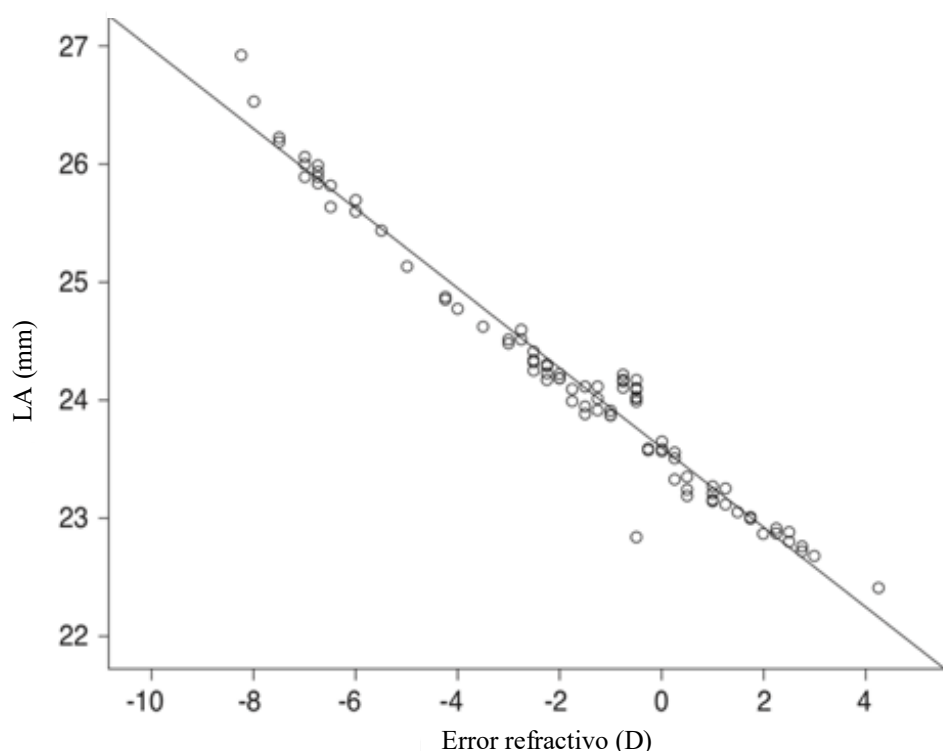


Figura 29. Relación entre el error de refracción y la longitud axial. D = dioptrías. Yang and Koh, 2015.

Por encima de estos valores hablamos de alta miopía, también llamada miopía magna, miopía degenerativa, miopía progresiva o miopía maligna (Liang et al., 2004). Este tipo de miopía se caracteriza por un alargamiento progresivo del globo ocular ininterrumpido durante toda la vida. Se acompaña de una atrofia progresiva de los tejidos oculares y de una degeneración progresiva de la retina y de la coroides en el polo anterior, especialmente en las áreas de la mácula y el disco óptico (Ohno-Matsui et al., 2011). Todo ello lleva a la ceguera con los años en un gran porcentaje de la población afectada, implicando notables recursos sanitarios.

Se ha establecido una correlación positiva entre el grado de elongamiento, los años de evolución de la miopía, la LA y la repercusión en la visión, ya que la alta miopía conlleva una atrofia del EPR y de la coroides. Esta atrofia genera una disminución del acceso de la retina a moléculas fundamentales para su funcionamiento que provoca, entre otras cosas, una situación de estrés oxidativo (Zhu et al., 2018), tal como ya ha sido demostrado en otras enfermedades retinianas y maculares con atrofia del EPR y coroides (Winkler et al., 1999). Por tanto, la alta miopía no es tan sólo una miopía baja con más dioptrías, sino que es una enfermedad ocular grave no resuelta que puede causar una discapacidad visual permanente (Gözümlü et al., 1997).

La prevalencia de la AM en personas mayores de 40 años es de un 4-8% en Estados Unidos, Australia y Europa occidental (Pan et al., 2013) aunque parece que es mayor en Asia (Vitale et al., 2009). Más concretamente, en España se conoce que entre un 2-3% de la población la padece, lo que supone más de 900.000 afectados de acuerdo con la encuesta de Discapacidad, autonomía personal y situaciones de dependencia del año 2008, realizada por el Instituto Nacional de Estadística (INE). Además de la falta de un adecuado tratamiento, otro de los factores que dificultan frenar esta “epidemia silenciosa” es el hecho de que el único parámetro diferenciador para que una baja miopía pase a alta miopía es tener más de -6D o más de 26 mm de longitud axial, cuando el daño sobre la retina ya es prácticamente irreversible.

1.4.6 Tratamiento farmacológico de la miopía

El deterioro visual de la AM no tiene prevención ni tratamiento eficaz hoy en día (Walline JJ, 2016). Esto es debido a que las causas que determinan la aparición y progresión de la miopía no están bien conocidas, pareciendo evidente que existe una multifactorialidad con la intervención de factores genéticos y ambientales. El desconocimiento de cómo se interrelacionan estos factores entre sí origina que la miopía, especialmente la miopía alta, sea actualmente una de las primeras causas de ceguera. Además, se produce un enmascaramiento diagnóstico dentro de las degeneraciones retinianas, por la falta de un patrón molecular que permita caracterizar estos pacientes permitiendo un diagnóstico precoz, un seguimiento adecuado para predecir la evolución y el desarrollo y la evaluación de dianas terapéuticas.

Se hizo un intento con agentes farmacológicos para evitar que se desarrolle la miopía. Destacan (Recko and Stahl, 2015):

- **Atropina.** Se emplea el uso de la atropina a una concentración de 0,01% (Grzybowski et al., 2015). La atropina es un antimuscarínico que reduce la acomodación y provoca midriasis. Aunque logró reducir el crecimiento de la miopía sin saber su mecanismo (Chua et al., 2006), se observaron algunos efectos que hacen imposible su uso clínico (Tong et al., 2009; Tay et al., 2017).
- En un esfuerzo por reducir los efectos secundarios de la atropina, en particular la ciclopejía, se empezó a estudiar el gel de **pirenzepina** al 2% (Tan et al., 2005). La pirenzepina es un antagonista muscarínico que compite con el receptor celular del neurotransmisor acetilcolina. Se ha investigado su uso para el control de la miopía (Czepita D, 2005), con resultados evidenciando efectividad y pocos efectos secundarios (Siatkowski et al., 2004; Siatkowski et al., 2008). Aunque la pirenzepina muestra un potencial uso terapéutico clínico para reducir la progresión miope, los obstáculos financieros y regulatorios han detenido su desarrollo posterior (Leo and Young, 2011).
- Otros fármacos antimuscarínicos, la **tropicamida** y la **escopolamina**, disminuyen la progresión de la miopía (Abraham SV, 1966; Aller TA, 2014). Sin embargo, no ofrecen otras ventajas como fármaco con respecto a la atropina.
- Está en fase de estudio un metabolito de la cafeína y la teobromina, que muestra grandes resultados, el compuesto **7-metilxantina (7-MX)** (Singh et al., 2019). A diferencia de la cafeína, esta molécula no puede entrar en el cerebro. Por lo tanto, no provoca ni nerviosismo ni incapacidad para dormir. Se estudiaron en las fibrillas de colágeno en la esclerótica en conejos. Los investigadores encontraron que la 7-MX aumenta la densidad del colágeno en la parte posterior de la esclera, pudiendo prevenir las miopías axiales (Nickla et al., 2006). Sin embargo, tras un período de un año, aunque se descubrió que es seguro, su efecto sobre la progresión de la miopía fue muy pequeño (Trier et al., 2008)

El conocimiento completo de las vías moleculares involucradas en el crecimiento ocular humano podría ser esencial para poder avanzar en los tratamientos.

1.4.7 Estrés oxidativo y miopía

El hecho de que la retina consuma grandes cantidades de oxígeno (Sickel, 1972), la exposición ilimitada a la luz y que los bastones son células metabólicamente muy activas, hacen susceptible a la retina de que se puedan generar EROs, siendo uno de los tejidos con el entorno oxidativo más elevado (Lamb and Pugh, 2006; Marquioni-Ramella and Suburo, 2015).

El estrés oxidativo y la producción desproporcionada de las EROs desempeñan un papel vital en la fisiopatología de numerosas enfermedades oculares, como el glaucoma (Chalasanani et al., 2007), cataratas (Kisic et al., 2012), uveítis (Mérida et al., 2013), retinopatía diabética (Izuta et al., 2010), DMAE (Ye et al., 2013), incluida la miopía (Nita and Grzybowski, 2016). Nuestro grupo de investigación propuso que el daño oxidativo juega un papel esencial en la miopía, al mostrar diferencias significativas relacionadas con la peroxidación lipídica entre pacientes bajos y altos miopes (Bosch-Morell et al., 1996).

Sin embargo, hay poca información sobre la importancia de la capacidad antioxidante en pacientes con miopía. Parece que la atrofia coroidea sería una de las causas del deterioro retiniano (Romero et al., 1988), ya que podría conducir a hipoxia (Bhatt et al., 2010) y generaría una disminución del acceso de la retina a moléculas fundamentales para su funcionamiento: vitamina A para regenerar el pigmento visual, lípidos para la renovación de los discos de los fotorreceptores, etc. Este podría ser uno de los aspectos clave para explicar la relación entre el estrés oxidativo y la miopía, ya que esta circunstancia existiría de manera crónica en esta enfermedad, al desencadenar una cascada de eventos, incluida la pérdida del epitelio pigmentario y los fotorreceptores (Juel et al., 2013). Nuestro grupo de investigación ha sugerido que la situación de atrofia vascular progresiva de los altos miopes provocaría procesos de isquemia, causando la producción de radicales libres (Bosch-Morell et al., 2015). Algunos estudios demuestran esta relación, en la que existe una mayor oxidación de glutatión en el humor vítreo de los altos miopes (Simonelli et al., 1989; Micelli-Ferrari et al., 1996).

1.4.8 Óxido nítrico y miopía

El NO es una molécula que tiene una vida media de unos pocos segundos y diversas funciones fisiológicas y celulares (Bredt and Snyder, 1990). Los vertebrados expresan tres isoformas diferentes, que se identificaron y describieron por primera vez en el año 1989 y se relacionaron con las enfermedades neurodegenerativas (Boll et al., 2008). El óxido nítrico desempeña un papel relevante en el ojo como neuromodulador y vasodilatador, pero también actúa como regulador del crecimiento del ojo, una propiedad que es especialmente interesante para la miopía (Goldstein et al., 1996). El NO es una molécula de señalización importante con múltiples funciones fundamentales en la respuesta inflamatoria. Debido a su electrón desapareado, el NO es un radical libre descargado, con el electrón desapareado más cerca del átomo de nitrógeno de la molécula de $\text{NO:N}\cdot=\text{O}$.

Se han identificado tres isoformas de NOS muy distintas, productos de diferentes genes, con diferente localización, regulación y propiedades catalíticas. Estas isoformas están ubicadas en las células endoteliales, en las células astrogiales y en algunas neuronas (Moncada et al., 1991), y fueron identificadas por primera vez en el año 1989.

Las tres isoformas de la enzima NOS son (Vielma et al, 2012):

- **nNOS** (también conocida como Tipo I, NOS-1) es la primera isoforma encontrada (y predominante) que se expresa en las neuronas y produce óxido nítrico en el tejido nervioso, tanto central como periférico. También se expresa en los músculos esqueléticos (Knowles and Moncada, 1994).
- **iNOS** (también conocida como Tipo II, NOS-2) es la isoforma inducible en una amplia gama de células y tejidos distintos (Crane et al., 1997; Alderton et al., 2001). iNOS se expresa en una amplia gama de tipos de células que incluyen los condrocitos, las células epiteliales, los hepatocitos y varios tipos de células del sistema inmunitario (Asano et al., 1994; Bogdan, 2001). A diferencia de nNOS y eNOS, iNOS se induce por citoquinas inflamatorias y muestra una relativa insensibilidad al Ca^{2+} (Kone et al., 2003). Se asocia principalmente con la inflamación y estados patológicos.

- **eNOS** (también conocida como Tipo III, NOS-3) es la primera isoforma encontrada en las células endoteliales vasculares. Es una isoforma dependiente de Ca^{2+} que se encarga de generar óxido nítrico en los vasos sanguíneos y está involucrada en la regulación de la función vascular. Se pueden encontrar en los fibroblastos dérmicos, en los queratinocitos epidérmicos, en los hepatocitos y en las células del músculo liso.

La existencia de tres isoformas de NOS, inducibles (iNOS), neuronales (nNOS) y endoteliales (eNOS) en el ojo con funciones muy diferentes, complica enormemente la interpretación de NOS.

Se han hecho numerosos intentos para estudiar su papel en la aparición y el desarrollo de la miopía mediante el uso de inhibidores de NO. De hecho, una inyección intravítrea de un inhibidor de NOS, N- ω -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, de las siglas en inglés *N- ω -nitro L-Arginine Methyl Ester*) ha demostrado que inhibe el desarrollo de la miopía (Fujikado et al., 1997; Fujikado et al., 2011).

Estos estudios examinaron el efecto de la L-NAME en la modulación del espesor coroideo en relación con el desenfoque miópico. Los resultados mostraron que la L-NAME cambió el espesor de la coroides. Por lo tanto, el NO puede desempeñar un papel en la modulación de grosor coroideo y por lo tanto ayudar al desenfoque miópico

Las tres isoformas de NOS desempeñan diferentes roles en los mecanismos reguladores de un ojo miope, incluida la regulación del crecimiento ocular (Fujii et al., 1998). La utilización más reciente de inhibidores específicos de cada isoforma está empezando a aclarar el peso de cada una de ellas en el desarrollo de la miopía (Nickla et al., 2009), ya que el NO puede interactuar con el O_2 , los aniones O_2^- y los compuestos tilo, generando especies reactivas de nitrógeno (Hogg et al., 1996), como los peroxinitritos, que pueden causar estrés oxidativo y posiblemente neurotoxicidad (Beckman et al., 1990).

1.4.9 Factores de crecimiento y miopía

La genética ha demostrado constantemente que la miopía está relacionada con varios factores de crecimiento en la miopía magna, que son:

- **TGF- β** (Jobling et al., 2004; Chen et al., 2013). Hasta la fecha, muchos estudios han demostrado la presencia de las tres isoformas de TGF- β en varias estructuras oculares (Connor Jr TB et al., 1989; Gordon-Thomson et al., 1998). Estudios posteriores en un modelo animal de pollo evidenciaron que el TGF- β puede desempeñar un papel en el crecimiento ocular (Kusakari et al., 2001).
- **FGF** (Rohrer and Stell, 1994; Seko et al., 1995). Varios trabajos posteriores de distintos equipos llegaron a la conclusión de que el factor de crecimiento de fibroblastos es un potente neuroprotector para diferentes tipos de células retinianas, incluidos los fotorreceptores (Hicks, 1998; Chaum, 2003). Sun et al., han mostrado que las variantes genéticas del FGF están asociadas con la susceptibilidad de la alta miopía en niños (Sun et al., 2019).
- **IGF1** (Deng et al., 2010; Metlapally et al., 2010). Es un factor que se centra en la desregulación del control del crecimiento ocular (Guo et al., 2015). Se ha demostrado que el IGF desempeña un papel imprescindible para controlar el desarrollo del globo ocular (Cuthbertson et al., 1989).
- **PEDF**, una glicoproteína de 50 kDa que se identificó por primera vez en las células del epitelio pigmentario retiniano (Tombran-Tink and Johnson, 1989). El PEDF no sólo es un inhibidor potente de la angiogénesis en el ojo, sino que también tiene funciones neuroprotectoras.
- **VEGF**, se centra en la neovascularización coroidea miópica (CNV) (Wakabayashi et al., 2013). Las variaciones en los niveles de VEGF en el humor acuoso en la miopía alta, podrían reflejar indirectamente la naturaleza y la patogénesis de esta fase de la alta miopía.

- **HGF**, que no solamente interviene a nivel vascular, sino que también desempeña un papel neuroprotector (Hornbeak and Young, 2009).

De todos estos factores, nos centramos en esta tesis doctoral en el VEGF y en el HGF.

1.4.9.1 Factor de crecimiento endotelial vascular

El VEGF fue purificado por primera vez en el 1989 (Ferrara and Henzel, 1989; Gospodarowicz et al., 1989) y descubierto como factor de permeabilidad (Aiello et al., 1997). Es una proteína de 46 kDa, que se disocia en dos subunidades de 23 kDa cada una. El VEGF, también conocido como el factor de permeabilidad vascular, es una citoquina multifuncional que ejerce varias acciones sobre el endotelio vascular (Senger et al., 1993; Chen et al., 2019).

Se trata de un potente factor de crecimiento conocido por jugar un papel importante en la formación y el mantenimiento de las estructuras vasculares (Ferrara et al., 2003; Grunewald et al., 2006), sospechando que esta molécula podría desempeñar un papel en la regulación del crecimiento fisiológico y patológico de los vasos sanguíneos (Ferrara, 2004; Arjunan et al., 2018). Estas funciones son mediadas a través de dos de sus receptores tipo quinasas de tirosina: VEGFR1/Flt1 y VEGFR2/Flk1 (Shih et al., 2003). Recientemente se ha demostrado que el VEGF es una importante molécula de señalización para la protección neuronal y la neurogénesis (Schratzberger et al., 2000; Carmeliet, 2003). El VEGF es un mitógeno de células endoteliales y un factor de vasopermeabilidad (Sawada et al., 2011).

La angiogénesis es la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los ya existentes. Durante años, el papel del VEGF en la regulación de la angiogénesis ha sido objeto de investigación (Leung et al., 1989; Ferrara, 2002). Existen muchos activadores de los factores angiogénicos (Risau, 1997; Folkman, 2006). Los factores proangiogénicos son el VEGF (Ferrara et al., 1992; Miller et al., 2013), el FGF, el factor inducible por hipoxia (HIF, de las siglas en inglés *Hypoxia-Inducible Factor*), TGF- α , TGF- β , angiopoyetina-1 (Suri et al., 1996), angiopoyetina-2, TNF- α , IL-8, etc. Aunque existen numerosos factores que estimulan la angiogénesis in vivo, no tienen porqué estar incrementados sus niveles en patologías oculares que cursan con daño retiniano (Hanneken et al., 1991; Meyer-Schwickerath et al., 1993).

También hay factores que modulan negativamente este proceso. Estos inhibidores de la angiogénesis son la trombospondina, la angiostatina, la endostatina y el PEDF (Li et al., 2003; Kaiser, 2006). De todos los factores implicados en la angiogénesis, el VEGF es el más importante (Millauer et al., 1993; Yancopoulos et al., 2000).

El VEGF provoca una respuesta angiogénica en una variedad de modelos *in vivo*, incluyendo la córnea de conejo (Philips et al., 1994), el iris de primates (Tolentino et al., 1996), etc. El VEGF también es un factor de supervivencia para las células endoteliales. El VEGF induce la expresión de las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 (Gerber et al., 1998). Varios estudios también han informado efectos mitogénicos en las células del EPR (Guerrin et al., 1995; Kurihara et al., 2012).

1.4.9.1.1 Receptores del factor de crecimiento endotelial vascular

El gen del VEGF humano está ubicado en el cromosoma 6p21.3 (Vincenti et al., 1996). El VEGF es una glicoproteína homodimérica de 46 kDa (Ferrara et al., 1991).

El VEGF ejerce sus efectos al unirse y activar los receptores de membrana tirosin-quinasa, a los que tiene gran afinidad (Jakeman et al., 1992): el VEGFR-1 y el VEGFR-2, que son expresados por las células endoteliales de la pared vascular. A pesar de ser el primer receptor en ser identificado (de Vries et al., 1992), la función precisa del VEGFR-1 aún es objeto de debate.

Por otra parte, el VEGFR-2 se liga al VEGF con una afinidad menor al VEGFR-1 (Terman et al., 1992). Existe en la actualidad un acuerdo general sobre que el VEGFR-2 es el mediador principal de los efectos mitogénicos, angiogénicos y de aumento de la permeabilidad del VEGF. La unión del VEGF a estos receptores inicia una cascada de señales que finalmente estimula el crecimiento, la supervivencia y la proliferación de las células del endotelio vascular (Ferrara, 1999). Existen varias isoformas de VEGF-A de las que las cuatro principales son el VEGF¹²¹, VEGF¹⁶⁵, VEGF¹⁸⁹ y VEGF²⁰⁶ (Houck et al., 1991; Tischer et al., 1991), siendo el más predominante en la retina el VEGF¹⁶⁵ (Houck et al., 1992; Dvorak et al., 1995). El índice hace referencia al número de aminoácidos de la molécula (Ferrara et al., 2003). De todos ellos, es el VEGF-A el que desempeña el papel fundamental en la angiogénesis.

El VEGF, tras unirse a su receptor, activa una serie de vías de transducción y señales con los siguientes resultados:

- **Migración de las células endoteliales vasculares.** El VEGF induce la expresión de activadores de plasminógeno de tipo uroquinasa y de tipo tisular, que promueven la degradación de la matriz extracelular local y facilita la migración celular endotelial (Ambati et al., 2003).
- **Supervivencia de células endoteliales inmaduras** (Holmes et al., 2007). El VEGF contribuye a evitar la muerte celular de las células del endotelio vascular de los vasos sanguíneos inmaduros, manteniendo así su viabilidad.
- **Aumenta la permeabilidad vascular.** Esta permeabilidad aumentada provoca la filtración de proteínas plasmáticas y la formación de un gel extravascular de fibrina, que proporciona un ambiente adecuado para el crecimiento de las células endoteliales.
- **Estimula la formación de vasos linfáticos** (linfagiogénesis) uniéndose a los receptores VEGFR.
- **Inhibe la respuesta inmunizadora del huésped ante los tumores**, ya que inhibe las células dendríticas y células presentadoras de antígeno que estimulan a los linfocitos B y T. El VEGF puede evitar la maduración funcional de las células dendríticas a partir de sus progenitoras hematopoyéticas.

1.4.9.1.2 El factor de crecimiento endotelial vascular en el ojo

La liberación del VEGF regulado por hipoxia juega un rol clave en el desarrollo normal de la vasculatura retiniana (Aiello et al., 1994; Aiello et al., 1995). Stone et al. en el año 1995 propusieron que la hipoxia conduce a la liberación de VEGF (Stone et al., 1995; Pierce et al., 1996). Es decir, que la situación de hipoxia y de un suministro insuficiente a nivel vascular y la reducción del O₂ que llega a la retina en la miopía podría conducir a la neovascularización para satisfacer las necesidades del ojo (Shweiki et al., 1992).

La expresión del ARNm del VEGF se correlaciona espacial y temporalmente con la neovascularización en varios modelos de isquemia retiniana en animales (Alon et al., 1995; Yi et al., 1998). Muchas células oculares producen VEGF, principalmente las células del epitelio pigmentario retiniano. Por eso, dado que, en ojos altamente miopes, los niveles decrecientes de VEGF son principalmente derivadas de células del EPR atroficas, así como de las células endoteliales vasculares de la coroides, puede existir cierta correlación entre la concentración de VEGF y el espesor de la coroides (Adamis et al., 1993).

En el ojo, la neovascularización intraocular ocurre en numerosos trastornos oculares, como puede ser la retinopatía diabética (Patz, 1980) y la miopía (Guichard et al., 2019).

Por otro lado, se sabe que el PEDF es un fuerte inhibidor de la neovascularización (Gao et al., 2001).

1.4.9.2 Factor de crecimiento de hepatocitos

El HGF se purificó por primera vez en el año 1984 del plasma de pacientes con insuficiencia hepática (Godha et al., 1986). Posteriormente, se demostró que el factor de crecimiento de hepatocitos afecta a numerosos tipos de células de diversos órganos (Boros and Miller, 1995; Zarnegar and Michalopoulos, 1995). El HGF tiene una variedad de funciones celulares (Matsumoto and Nakamura, 1996).

Los efectos biológicos del factor de crecimiento de hepatocitos no se limitan a la proliferación celular, sino también a la regulación del desarrollo celular, la motilidad, la morfogénesis, la migración y la adhesión celular (Stuart et al., 2000). Como se mencionó anteriormente, el HGF no sólo desempeña un papel vascular, sino también neuroprotector (Machida et al., 2004; Tönges et al., 2011). La expresión de HGF está aumentada en condiciones hipóxicas (Vasir et al., 2000).

En el ojo, el factor de crecimiento de hepatocitos y su receptor (He et al., 1998) se expresan ampliamente y desempeñan un papel crítico en muchos procesos fisiológicos y patológicos oculares (Sun et al., 1999; Daniels et al., 2003).

Se ha demostrado que la isquemia retiniana aumenta la expresión de HGF y su receptor c-met en las células de la retina (Shibuki et al., 2002). Por lo tanto, el efecto protector del HGF en pacientes con miopía sugiere que podría considerarse un tratamiento para los pacientes con algunas formas de miopía ya que todas las pruebas aumentan la posibilidad de que el HGF pueda intentar promover la supervivencia de las células del epitelio pigmentario retiniano bajo condiciones hipóxicas y de estrés (Ohtaka et al., 2006).

Además, se ha informado que el HGF promueve también la curación de heridas (Miura et al., 2003) y participa en los procesos de cicatrización.

El HGF también ha demostrado ser capaz de proteger el sistema antioxidante, debido a que:

- Es capaz de elevar los niveles de glutatión, aumentando la actividad de la gamma-glutamilcisteínasintetasa (GCS), la enzima limitante de la velocidad de la biosíntesis de GSH (Tsuboi et al., 1999).
- Produce la recuperación de GSH mitocondrial y es capaz de proteger al EPR humano de la muerte celular inducida por el agotamiento del glutatión (Jin et al., 2004).
- Activa genes antioxidantes, como la catalasa (Kannan et al., 2004).

El HGF puede ser una molécula trascendental en los mecanismos contra la hipoxia miópica y en la prevención del daño oxidativo (Zhou and Williams, 1999).

Las metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMP) y los inhibidores tisulares endógenos de las MMP (TIMP) son críticos en el desarrollo de la esclerótica, que es un cambio particularmente notable en la miopía alta o degenerativa (Gentle et al., 2003; McBrien and Gentle, 2003). Se encontró que el HGF estaba estrechamente relacionado con las actividades biológicas de las MMP y los TIMP (Dunsmore et al., 1996; Hamasuna et al., 1999).

El HGF protege varios tipos de células contra la muerte celular inducida por varios estímulos (Hiscox and Jiang, 1999; Yuan et al., 2001). En un estudio in vitro, el tratamiento de las células del EPR con HGF elevó notablemente la GSH mitocondrial y protegió al EPR de la muerte celular inducida por la activación de la caspasa-3 (Jin et al., 2005).

2. Hipótesis

2. Hipótesis

Las hipótesis que se proponen en este trabajo son las siguientes:

1. El uso de la TRX, aplicado como tratamiento frente a la degeneración retiniana en los ratones rd1, es capaz de aumentar la capacidad de supervivencia celular en el momento de la degeneración, pudiendo modificar los cambios asociados a la inflamación y a los parámetros de estrés oxidativo.
2. Existen diferencias en la concentración de VEGF Y HGF en el humor acuoso de los pacientes miopes bajos, miopes altos y controles.
3. Existen alteraciones en los parámetros de estrés oxidativo en la retinosis pigmentaria y en la miopía.

3. Objetivos

3. Objetivos

En el presente trabajo se plantearon los siguientes objetivos:

1. Estudiar si la administración de TRX es capaz de modular la muerte celular en la retina de un modelo animal de retinosis pigmentaria, el ratón rd1.
2. Determinar las concentraciones de los factores de crecimiento VEGF y HGF en la retina de los ratones control y con RP, y ver si se modifican después del tratamiento con TRX.
3. Estudiar las alteraciones de la glía que suceden a lo largo del tiempo con la administración de la TRX en el modelo animal de ratón rd1.
4. Estudiar los cambios en los parámetros de estrés oxidativo (GSH y GSSG) y en la concentración del neurotransmisor glutamato en la retina del ratón tras la administración de la TRX.
5. Determinar las concentraciones de los factores de crecimiento VEGF y HGF en el humor acuoso de pacientes emétopes, bajos miopes y altos miopes.
6. Estudiar si existe alguna relación entre los factores de crecimiento VEGF y HGF y alguno de los parámetros clínicos estudiados en estos pacientes.
7. Determinar las concentraciones de GSH, GSSG, glutamato y nitritos en el humor acuoso de estos pacientes para valorar la existencia de una situación de estrés oxidativo en miopía.