

UNIVERSIDAD CEU-CARDENAL HERRERA
CEINDO-CEU ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

PROGRAMA: MEDICINA TRASLACIONAL



CEU

*Escuela Internacional
de Doctorado*

**“MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS Y DE PROTECCIÓN
EN LAS ENFERMEDADES OCULARES EN RELACIÓN CON
LA MIOPIA ALTA”.**

Tesis doctoral presentada por Enrique García Gen

Directores: Dr. Francisco Bosch Morell, Dr. Salvador Mérida Donoso y Dra. Carmen Desco
Esteban

VALENCIA 2021

LISTA DE ABREVIATURAS.....	5
ÍNDICE DE FIGURAS.....	9
INTRODUCCIÓN.....	14
1. Estructura del ojo.....	15
1.1 División anatómica y funcional del globo ocular.....	15
2. Estructura de la retina.....	18
2.1 Células y capas de la retina.....	18
2.1.1 Epitelio pigmentario de la retina.....	19
2.1.2 Capa de fotorreceptores.....	20
2.1.3 Membrana limitante externa.....	23
2.1.4 Capa nuclear interna.....	23
2.1.5 Capa de células ganglionares.....	25
2.1.6 Membrana limitante interna.....	26
3. Miopía.....	27
3.1 Prevalencia, distribución y fisiopatología de la enfermedad.....	27
3.2 Predisposición genética e interacciones genético-ambientales de la miopía.....	28
3.3 Miopía baja, normal o leve.....	28
4. Miopía alta, magna o degenerativa.....	29
4.1 Regulación del crecimiento ocular y miopía alta.....	30
4.1.1 Control local del crecimiento ocular: la experiencia visual.....	30
4.1.2 Papel de la coroides en el crecimiento ocular.....	40
4.1.3 Reorganización escleral en la miopía.....	41
4.2 Hipoxia y estrés oxidativo en la miopía alta.....	42
4.2.1 HIF y sus dianas génicas, los Elementos de Respuesta a Hipoxia.....	45
4.2.2 HIF y el desarrollo de vasculopatías en la Miopía alta.....	47
4.3 El sistema del complemento en la miopía alta.....	50
4.3.1 Regulación de la vía alternativa del complemento: factores H, D, B e I.....	54
4.4 Complicaciones clínicas derivadas de la miopía alta: el estafiloma posterior y la maculopatía miope.....	57
4.4.1 El estafiloma posterior.....	57
4.4.2 La maculopatía miope.....	58
5. Modelos animales.....	64
5.1 El pollo: un excelente modelo de miopía.....	65
5.1.1 Características anatómicas y fisiológicas de Gallus gallus.....	65
HIPÓTESIS.....	70
OBJETIVOS.....	72

MATERIAL Y MÉTODOS.	74
1. Análisis de los factores H y D del complemento en muestras de humor acuoso humano.	75
1.1 Extracción y manejo de las muestras.	75
1.2 Diseño experimental.	75
1.2.1 Detección mediante la técnica de ELISA.	76
2. Análisis de las citocinas y los factores de crecimiento regulados por hipoxia en muestras de humor acuoso humano.	78
2.1 Extracción y manejo de las muestras.	78
2.2 Diseño experimental.	79
2.2.1 Detección de citoquinas y factores de crecimiento relacionados con hipoxia. ...	80
3. Tratamiento estadístico de los resultados.	83
RESULTADOS.	84
1. Análisis del sistema del complemento en muestras de humor acuoso humano.	85
1.1 Características clínicas de los pacientes objeto de estudio.	85
1.2 Aumento significativo de concentración de FH en el grupo de miopía alta.	90
1.3 Reducción significativa del espesor coroidal en el grupo de miopía alta.	90
1.4 Correlación entre la longitud axial del globo ocular y el espesor coroidal.	91
1.5 Correlación entre la longitud axial y los niveles del complemento.	92
1.6 Correlación entre el espesor coroidal y el FH.	92
1.7 El estiramiento axial del ojo condiciona la progresión de la maculopatía.	93
1.8 La reducción del espesor coroidal favorece la progresión de la maculopatía.	94
1.9 La mayor concentración de FH condicionan un mayor grado de maculopatía.	95
2. Estudio de los productos activados por hipoxia en humor acuoso humano.	97
2.1 Características clínicas de los pacientes del estudio.	97
2.2 Distribución de las concentraciones de los marcadores en los grupos experimentales y su relación con el desarrollo de la maculopatía miope.	99
2.2.1 Aumento significativo de la concentración de HGF en pacientes con miopía alta, especialmente en aquellos que desarrollan atrofia coroidal profunda.	99
2.2.2 Regulación a la baja de HIF a medida que avanza el grado de miopía.	101
2.2.3 Regulación a la baja de VEGF a medida que avanza el grado de miopía.	102
2.2.4 Ausencia de cambios significativos en los niveles de PDGF-BB entre grupos. ...	103
2.2.5 No hay diferencias significativas en los niveles de IL-6 e IL-17 entre grupos. ..	104
DISCUSIÓN.	106
1. La miopía alta se asocia a una alteración de la expresión de los factores reguladores de la vía alternativa del complemento.	108
1.1 La miopía alta se asocia con una regulación al alza del CFH y éste, a su vez, con el desarrollo de la maculopatía miope.	109

1.2 No hay cambios significativos en los niveles del FD del complemento entre miopes y no miopes.....	112
2. La progresión de la miopía alta determina la aparición de cambios estructurales en el segmento posterior del ojo entre los que destaca el adelgazamiento coroideo y la reorganización escleral.....	113
3. El estiramiento axial del globo ocular característico de la miopía alta mantiene una estrecha relación con la alteración de la expresión de HGF y factores crecimiento involucrados en el crecimiento ocular.....	114
4. La situación de hipoxia generada como consecuencia del alargamiento posterior del ojo mantiene una estrecha relación con el brote anómalo de nuevos vasos y un mayor riesgo de degeneración macular.....	117
CONCLUSIONES.....	124
BIBLIOGRAFÍA.....	126

LISTA DE ABREVIATURAS.

AMPC: Adenosín monofosfato cíclico

ANG: Angiopoyetina

ARVO: Asociación para la investigación en oftalmología y la visión

ATP: Adenosín trifosfato

bHLH-PAS: Proteínas con motivos hélice bucle hélice

CCG: Capa de células ganglionares

CNE: Capa nuclear externa

CNI: Capa nuclear interna

COL IV: Colágeno tipo IV

CPE: Capa plexiforme externa

CPI: Capa plexiforme interna

DA: Dopamina

DAPI: 4,6-diamidino-2-fenilindol

DMAE: Degeneración macular asociada a la edad

DOPAC: 3,4-dihidroxifenilacético

ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

EPR: Epitelio pigmentario de la retina

FB: Factor B del complemento

FD: Factor D del complemento

FGF: Factor de crecimiento de fibroblastos

FH: Factor H del complemento

FI: Factor I del complemento

GABA: ácido gamma aminobutírico

GFAP: Proteína ácida fibrilar glial

HE: Hematoxilina-eosina

HGF: Factor de crecimiento de hepatocitos

HIF: Factor inducible por hipoxia

IGF: Factor de crecimiento de tipo insulina

IL 6: Interleucina 6

IL 17: Interleucina 17

iNOS: Óxido nítrico sintasa inducible

ipRGCs: Células ganglionares intrínsecamente fotosensibles

LA: Longitud axial del globo ocular

L-DOPA: 3,4-dihidroxi-L-fenilalanina

LWS: Longitud de onda larga

MLI: Membrana limitante interna

MMPs: Metaloproteinasas de la matriz

NRP: Neuropilinas

OCT: Tomografía de coherencia óptica

PBS: Tampón fosfato

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas

PEDF: Factor de crecimiento derivado del epitelio pigmentario

PIGF: Factor de crecimiento placentario

PN: Día postnatal

PVhl: Proteína supresora de tumores Von Hippel-Lindau

RH: Longitud de onda media

ROS: Especies reactivas de oxígeno

SD-OCT: Tomografía de coherencia óptica de dominio espectral

SMA- α : Activa de músculo liso α

SWS1: Longitud de onda corta

SWS2: Longitud de onda extremadamente corta

TGF: Factor de crecimiento transformante

TH: Tirosina hidroxilasa

TIMPs: Inhibidores de las metaloproteinasas de la matriz

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura1. Esquema de las cámaras y tejidos que constituyen el ojo humano. Adaptado de (3).
15

Figura2. Figura 2: Representación esquemática del ojo humano y la retina. A) Anatomía del ojo humano con B) detalle de la estructura y los componentes celulares de la retina (24)..... 18

Figura 4: Esquema general de A) anatomía de conos y bastones con B) detalle ultraestructural de los segmentos externo e interno de cada tipo de fotorreceptor. Adaptado de Ross, 2013. .. 21

Figura 5: Esquema de los tipos celulares que conforman la retina. Las letras mayúsculas se corresponden con los tipos celulares; C, conos; R, bastones; M, células de Müller; A, células amacrinas; B, células bipolares; H, células horizontales; G, células ganglionares. Adaptado de (44). 23

Figura 6: Mapa geográfico de prevalencia de miopía. Adaptado de (74)..... 27

Figura 7: Diagrama de los múltiples planos de enfoque de un ojo hipermetrópico (parte superior de la imagen) y miópico (parte inferior). En el caso de un ojo hipermetrope, las longitudes de onda más cortas (azules) están enfocadas más fuertemente que las medias (verdes) o largas (rojas). Por su parte, en un ojo miope, son las longitudes de onda largas (rojas) las que están enfocadas (103,107)..... 31

Figura 8: esquema del funcionamiento de la dopamina en la retina humana bajo condiciones de iluminación. El incremento de su síntesis y liberación por las células amacrinas reduce el tamaño de los campos receptivos al inducir un menor acoplamiento de las células horizontales, lo que simula una imagen bien enfocada en la retina sin necesidad de que el ojo se vuelva miope. Elaboración propia. 34

Figura 9: a) esquema general de la arquitectura retiniana y b) detalle de la comunicación intercelular a nivel retiniano establecida por sinapsis excitadoras mediadas por el glutamato, y las inhibitoras, mediadas por GABA y sus moléculas relacionadas como Dopamina y Cl-. Elaboración propia. 36

Figura 10: detalle de los lugares de acción de los factores de crecimiento endotelial vascular (VEGF), del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDFG) y del sistema del complemento sobre el equilibrio VEGF/PEDF. Elaboración propia..... 39

Figura 11: esquema del papel que la hipoxia tiene en la reorganización escleral y coroidea necesarios para la elongación axial del globo ocular. La estabilización del factor inducible por hipoxia (HIF) favorece la transdiferenciación de fibroblastos a miofibroblastos, lo que conduce a la menor producción de colágeno tipo I y al debilitamiento estructural de la esclera. Todo ello favorece la elongación axial del globo ocular y el desarrollo de miopía. Elaboración propia. 42

Figura 12: A) arquitectura especial de la vasculatura retiniana con una arteria central que penetra en el disco óptico a través de la lámina cribosa y se ramifica en arteriolas más pequeñas para irrigar los dos tercios interiores de la retina. El sistema venoso de drenaje tiene una organización muy similar; B) detalle de los grandes vasos coroideos que nutren, por difusión, a la capa de fotorreceptores avascular y al epitelio pigmentario de la retina. Adaptado de (162).
44

Figura 13: Esquema general del metabolismo de HIF. Bajo condiciones normóxicas, HIF-1 α se hidroxila rápidamente por las enzimas prolil hidroxilasas y es reconocida por la proteína supresora de tumores pVHL. Tras la poliubiquitinación la subunidad HIF-1 α es degradada vía proteasoma 26S. En condiciones hipóxicas, HIF-1 α trasloca al interior nuclear y dimeriza con la subunidad HIF-1 β , tras lo cual se une al DNA y activa la expresión de los elementos de respuesta

a hipoxia, que incluyen una serie de respuestas entre las que destacan la síntesis de factores de crecimiento relacionados con la glucólisis, la angiogénesis y enzimas relacionadas con el metabolismo anaeróbico. Adaptado de RayBiotech ELISA kit. 46

Figura 14: Esquema general de la vasculogénesis inducida como consecuencia de la hipoxia. Adaptado de (131). 49

Figura 15: vista molecular de la cascada de activación, amplificación y regulación del complemento. A) en la vía clásica las moléculas de reconocimiento de patrones perciben la presencia de patógenos. Este reconocimiento induce la autoactivación de C1r, el cual activa a C1s. Todo ello es seguido por la escisión de C4 y C2 y la posterior formación de la convertasa C3. En la vía de las lectinas, los patrones de glucanos se detectan a través de MBL, CL-LK o ficolinas, lo que conduce a la activación de MASP y a la formación de la misma convertasa C3. Las convertasas C3 escinden C3 en C3b, que también se une a la superficie del activador. El C3b recluta al FB, lo que conduce a la activación de FB y a la formación de C3bBb, que escinde más C3 y amplifica la activación del complemento. Ambas convertasas de C3 unidas a la superficie pueden unirse a una molécula de C3b por lo que se forman las convertasas C5, que escinden C5 en C5a y C5b, iniciando así la vía terminal y la formación del complejo de ataque de membrana (MAC). B) la activación y amplificación del complemento se atenúa en la superficie del huésped. Las células sanas expresan reguladores como el FH que actúan como cofactores para la degradación mediada por FI o impiden el ensamblaje de MAC. Adaptado de (193). 51

Figura 17: esquema de los diez tipos de estafiloma diferentes según la clasificación de Curtin 1977. 58

Figura 18: a) mosaicismo en el que el contorno de los vasos coroideos es fácilmente visible en el polo posterior; b) atrofia coriorretiniana difusa, con un color amarillento en el polo posterior; c) atrofia coriorretiniana irregular (flechas negras), con lesiones bien definidas de color grisáceo; d) atrofia macular. Adaptado de (215). 61

Figura 19: a) estrías lacadas (flecha blanca) con patrón lineal y b) mancha de Fuchs (flecha negra), que representa la fase de cicatrización de la neovascularización coroidea miope. Adaptada de (215). 62

Figura 20: a) modelo de miopía por privación en pollo Cobb 500 y b) modelo de miopía por inducción con lente. Ambas imágenes han sido tomadas por Enrique García Gen en los modelos experimentales llevados a cabo en una línea de investigación adicional a la presente tesis en la Granja Docente y de Investigación de la Universidad CEU-Cardenal Herrera y el Centro Interdisciplinario de Neurociencia de Valparaíso, Chile. 65

Figura 21: los pigmentos permiten clasificar los conos de los pollos: el diagrama incluye los siete tipos de fotorreceptores de la retina del pollo. En la parte superior derecha se muestra una sección teñida con hematoxilina eosina de una retina de pollo adulta (257). 67

Figura 22: anatomía comparada de la retina de ratón y pollo. a) esquema de la retina dicromática del ratón; b) esquema de los fotorreceptores tetracromáticos del pollo; c) microfotografía de un ratón sano y d) retina de pollo que muestra las diferencias relativas en el espesor de la capa nuclear entre ambas especies, con una INL más gruesa en el pollo (19). 68

Figura 23: clasificación de los pacientes según su longitud axial en miopes altos, bajos y controles.

75

Figura 24: clasificación de los pacientes que participaron en el estudio de hipoxia. La clasificación tuvo lugar según la longitud axial del globo ocular. 79

<i>Figura 25: esquema general del procedimiento de análisis mediante Multiarray.....</i>	<i>82</i>
<i>Figura 26: representación gráfica de la distribución de casos de estafiloma posterior en los ojos del estudio. Se puede observar una mayor incidencia y diversidad des estafiloma en el grupo de miopía alta frente a los grupos de miopía baja y control.</i>	<i>87</i>
<i>Figura 27: representación gráfica de la distribución del grado de maculopatía entre los grupos experimentales control, baja miopía y alta miopía. Se puede observar una mayor incidencia y variedad de la maculopatía miope en el grupo de miopía alta en comparación con el grupo de miopía baja.....</i>	<i>89</i>
<i>Figura 28: a) concentración media del factor H del complemento en humor acuoso; b) concentración media del factor D del complemento. Las barras de error representan la desviación típica de la media. Las diferencias significativas (*) fueron establecidas con un nivel de significación de $p<0.01$.....</i>	<i>90</i>
<i>Figura 29: a) cuantificación de los espesores corioideo y macular mediante OCT: a) representación gráfica del valor medio del espesor corioideo en los grupos experimentales de miopía alta, baja y control; b) representación gráfica del espesor macular medio determinado en los grupos experimentales por medio de OCT. Las barras de error muestras la desviación típica de la media. Las diferencias significativas (*) fueron establecidas con un nivel de significación de $p<0.01$... </i>	<i>91</i>
<i>Figura 30: correlación de Pearson entre el espesor corioideo y la longitud axial del globo ocular. Ambas variables se correlacionan de manera inversa, con una $R= -0.516$ y una significación de $p<0.01$.....</i>	<i>91</i>
<i>Figura 31: Análisis de correlación de Spearman entre la Longitud axial del globo ocular determinada mediante OCT y la concentración factor H del complemento determinada mediante ELISA con una significación de $p<0.01$. Ambas variables mantienen una correlación positiva y alta ($R= 0.728$).</i>	<i>92</i>
<i>Figura 32: análisis de correlación de Spearman entre la concentración del Factor H del complemento y el espesor corioideo determinada con un nivel de significación de $p<0.01$. Ambas variables mantienen una correlación inversa, de manera que aumentos en una variable determinan una disminución en los valores de la otra y viceversa ($R= -0.624$).</i>	<i>93</i>
<i>Figura 33: Representación gráfica del análisis de medias ANOVA de la longitud axial para cada tipo de maculopatía desarrollada por los pacientes del estudio. Las diferencias de medias (*) fueron establecidas con un nivel de significación de $p<0.01$. Las barras de error representan la desviación típica de la media.</i>	<i>94</i>
<i>Figura 34: representación gráfica del espesor corioideo medio determinado por OCT del conjunto de maculopatías que presentan los pacientes del estudio. Las diferencias de medias (*) fueron analizadas con una significación de $p<0.01$ y las barras de error muestran la desviación típica de la media.....</i>	<i>95</i>
<i>Figura 35: representación gráfica de la concentración media del factor H del complemento para cada una de las maculopatías presentes a lo largo del estudio. Las diferencias de medias (*) fueron establecidas con un nivel de significación de $p<0.01$. Las barras de error muestran la desviación típica de la media.</i>	<i>96</i>
<i>Figura 36: a) representación gráfica de la concentración media del factor de crecimiento de hepatocitos en los tres grupos experimentales. Las diferencias de medias (*) se establecen con un nivel de significación de $p<0.05$. Las barras de error muestran la desviación típica de la media; b) análisis de regresión entre el HGF y la longitud axial del globo ocular. Ambos parámetros</i>	

mantienen una $r= 0.349$, $p<0.01$; c) representación gráfica de la concentración media de HGF en función del grado de maculopatía desarrollado por el paciente. Las diferencias de medias () se establecen con un nivel de significación de $p<0.05$. Las barras de error muestran la desviación típica de la media; d) análisis de correlación de Pearson entre VEGF y HGF; e) análisis de correlación de Pearson entre el factor de crecimiento derivado de plaquetas y el HGF. Ambas variables mantienen una correlación positiva y alta ($p<0.01$). 100*

Figura 37: a) representación gráfica de la concentración del factor inducible por hipoxia 1 alfa en los grupos experimentales de miopía alta, baja y controles de emetropía. Las diferencias de medias () se establecieron con un nivel de significación de $p<0.05$ y las barras de error muestran la desviación típica de la media; b) recta de regresión y nube de puntos entre el HIF y la longitud axial del globo ocular, con una r de -0.341 , $p<0.05$; c) análisis de correlación de Pearson entre el factor inducible por hipoxia y el HGF con un grado de significación de $p<0.05$; d) análisis de correlación entre el HIF y el VEGF. 102*

Figura 38: a) representación gráfica de la concentración media del factor de crecimiento endotelial vascular en los grupos de miopía alta, baja y control. El análisis de medias HSD de Tuckey mostró una reducción significativa de la concentración de VEGF en el grupo de miopía alta en comparación con los grupos de miopía baja y control. Las diferencias de medias () fueron establecidas con un nivel de significación de $p<0.01$ y las barras de error muestran la desviación típica de la media; b) análisis de correlación de Spearman entre el VEGF y la longitud axial del globo ocular, con una $r= - 0.480$, $p<0.01$ 103*

Figura 39: a) representación gráfica de la concentración media del factor de crecimiento derivado de plaquetas en los grupos de miopía alta, baja y control. Las diferencias de medias () se establecieron con un nivel de significación de $p<0.05$ y las barras de error muestran la desviación típica de la media; b) análisis de correlación de Spearman entre el PDGF y la longitud axial del globo ocular. 104*

Figura 40: a) representación gráfica de la concentración de interleucina 6 entre los grupos experimentales. No se observan diferencias significativas entre los grupos; b) representación gráfica de las concentraciones medias de IL-17 en los grupos experimentales. No se observan diferencias significativas entre grupos..... 105

Figura 41: esquema general de los factores de crecimiento y proteinasas involucrados en el reorganización escleral. 116

Figura 46: visión integrada del proceso de degeneración retiniana y macular subyacente a la maculopatía miope. 122

INTRODUCCIÓN

1. Estructura del ojo.

1.1 División anatómica y funcional del globo ocular.

El globo ocular es una estructura de 22- 27 mm de diámetro anteroposterior y 69-85 mm de circunferencia (1,2), localizado en el interior de la cavidad orbitaria y sostenido por seis músculos extrínsecos que controlan su movimiento, así como por una capa de tejido adiposo alrededor de éste, que amortigua sus movimientos. Su función es la de enfocar los rayos luminosos provenientes del medio exterior sobre la retina, para lo que dispone de una anatomía especial compuesta por los siguientes elementos (Figura 1):

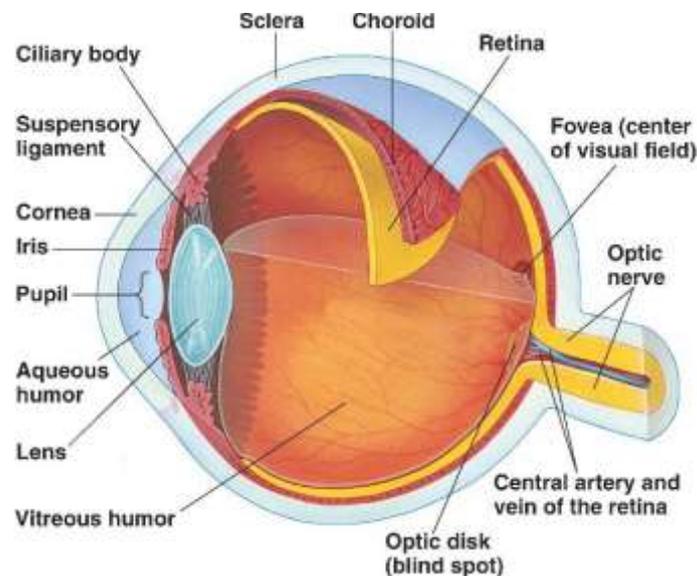


Figura1. Esquema de las cámaras y tejidos que constituyen el ojo humano. Adaptado de (3).

1. **La córnea:** es un tejido conectivo avascular y transparente que actúa como primera barrera estructural del ojo. Histológicamente está formada por cinco capas: el epitelio, el estroma y el endotelio, que se hayan separadas por la membrana de Bowman y la membrana de Descemet respectivamente. En el adulto tiene un diámetro de 11.5-12 mm y un grosor de 0,5 mm en el centro, aumentando dicho valor gradualmente hacia la periferia, lo que genera un sistema óptico esférico (4). Esta anatomía especial, le permite ser el principal elemento refráctil del ojo, aportando aproximadamente dos tercios del poder dióptrico ocular(2).
2. **Humor acuoso:** es el líquido que baña las cámaras anterior y posterior. Es sintetizado en el cuerpo ciliar a una velocidad de 2-3 ml/min por medio de secreción activa e

independiente de la presión intraocular. Este proceso comienza con el transporte activo de sodio hacia los espacios intercelulares, lo cual arrastra los iones cloruro y bicarbonato para mantener la neutralidad eléctrica. Este desplazamiento iónico provoca, en última instancia, la salida osmótica de agua desde los capilares sanguíneos y la solución resultante fluye desde los espacios intercelulares hacia la cámara anterior del ojo. Desde la cámara anterior, circula por delante del cristalino y sigue por el sistema trabecular donde, finalmente, es drenado en el canal de Schlemm, desembocando en las venas extraoculares (5). A lo largo de su recorrido desempeña funciones de nutrición de las estructuras avasculares anteriores (cristalino y córnea). Además, bajo condiciones de enfermedad, la concentración de algunos de sus metabolitos cambian, lo cual lo convierte en una prometedora herramienta de diagnóstico para las enfermedades oculares (6–8).

3. **Cristalino:** estructura biconvexa transparente que se encuentra suspendida y fijada a la superficie interna del cuerpo ciliar cuyos componentes principales son el colágeno tipo IV, laminina, entactina, perlecano, colágeno tipo XVIII, proteoglicano de sulfato de heparina y fibronectina (9,10). Su función principal es el enfoque preciso de la luz sobre la retina, para lo cual su forma es controlada por la musculatura ciliar. La musculatura ciliar presenta inervación parasimpática, cuya estimulación produce la contracción de las fibras, incrementando el grosor del cristalino y su poder dióptrico, proceso conocido como acomodación, que permite el enfoque de los objetos cercanos (11). La capacidad de acomodación se irá perdiendo con el envejecimiento debido a la desnaturalización progresiva de las proteínas del cristalino, llegando a la falta completa de acomodación en torno a la edad de 65 años (10,12).

4. **Cuerpo vítreo:** es la estructura más grande dentro del ojo. Ocupa aproximadamente el 80% del volumen intraocular. Tiene una consistencia gelatinosa, compuesta en un 98% de agua y una pequeña porción de proteínas, siendo el colágeno tipo II la proteína más abundante (13). Su función principal es la de mantener la forma interna del ojo, permitiendo a la retina contacto directo con el epitelio pigmentario; así como actuar de amortiguador de la estructura durante los movimientos oculares rápidos (14,15).

El globo ocular de los mamíferos se encuentra rodeado, a su vez, de tres estructuras:

1. **La túnica fibrosa**, que constituye la capa más externa e incluye tanto a la córnea como a la esclerótica.
2. **La túnica vascular o úvea**, formada por la coroides, el iris y el estroma del cuerpo ciliar.

La coroides es el manto vascular que cubre la retina, extendiéndose desde el nervio óptico hasta el cuerpo ciliar. Proporciona nutrientes a las células de la retina, así como constituye la barrera hematorretiniana para la difusión de los metabolitos a su través. Además de sus funciones vasculares y de protección, la coroides también contiene células secretoras probablemente involucradas en la modulación de la vascularización y en el crecimiento de la esclera (16–18).

El iris es un diafragma pigmentado situado posteriormente a la córnea que delimita la entrada de luz al interior del globo ocular para una correcta formación de las imágenes por medio de un proceso de adaptación, consistente en la mayor o menor apertura del tamaño de la pupila. La dilatación pupilar regula la cantidad de luz por medio de estimulación simpática y antagonistas muscarínicos (19).

El cuerpo ciliar es la porción engrosada de la túnica vascular situada inmediatamente posterior al iris. Está compuesto por dos músculos estriados esclerocorneales. Es el tejido encargado de la secreción de humor acuoso, participa de la barrera hematoacuosa y sirve como punto de fijación para los ligamentos suspensorios del cristalino (19,20).

3. **La túnica nerviosa o retina**, que es la capa más profunda y está compuesta por el epitelio pigmentario y la retina (21).

La anatomía especial del ojo responde a la necesidad de enfocar de manera correcta los haces luminosos provenientes del medio exterior sobre la retina. Para ello, las lentes que componen el sistema ocular (córnea y cristalino) refractan estos haces, enfocándolos sobre los fotorreceptores de la retina (12). Estas lentes son conocidas como aparato dióptrico o medios ópticos de difracción (Guyton and Hall, 2016). De esta manera, el ojo posee un sistema de lentes compuesto por cuatro superficies de refracción: 1) la separación entre el aire y la cara anterior de la córnea; 2) la separación entre la cara posterior de la córnea y el humor acuoso; 3) la separación entre el humor acuoso y la cara anterior del cristalino; 4) la separación entre el

cristalino y el humor vítreo. Considerando todas estas lentes como una sola, el poder dióptrico total del ojo es de 59 dioptrías cuando la acomodación del cristalino responde a la visión de lejos (Guyton and Hall, 2016).

Una vez que el haz luminoso llega a la retina es convertido en impulsos nerviosos que son enviados a través del nervio óptico hasta el cerebro, donde se produce la visión propiamente dicha.

2. Estructura de la retina.

La retina es la porción del ojo sensible a la luz y está compuesta fundamentalmente por dos capas: una capa nerviosa situada internamente en donde se localizan los fotorreceptores, las neuronas de conducción y las células de sostén, y una capa no nerviosa más exterior constituida por el epitelio pigmentario de la retina, el cual se haya unido a la capa coriocapilar por medio de la membrana de Bruch (22,23).

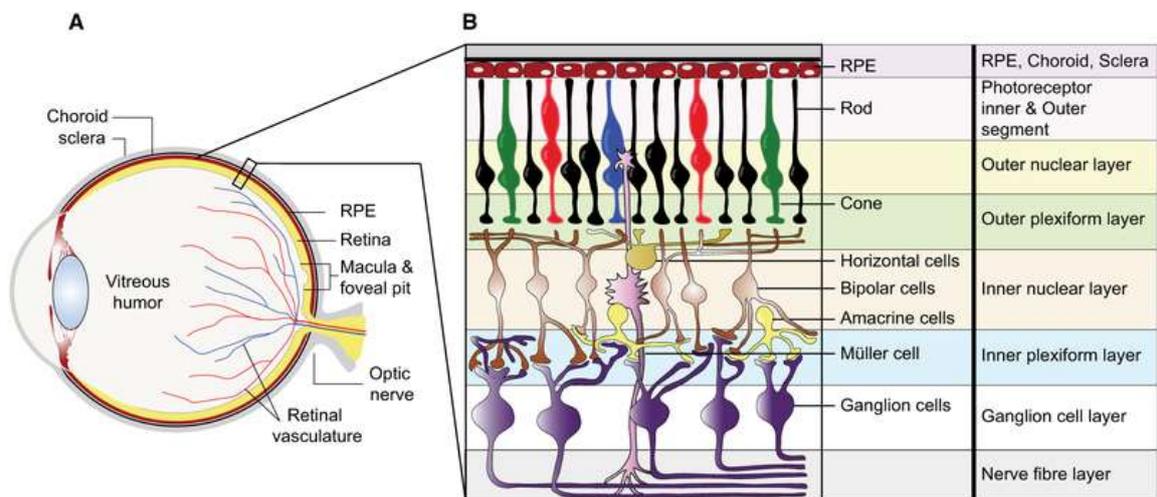


Figura2. Representación esquemática del ojo humano y la retina. A) Anatomía del ojo humano con B) detalle de la estructura y los componentes celulares de la retina (24).

2.1 Células y capas de la retina.

El plan básico estructural de la retina está altamente conservado en el linaje de mamíferos, con una parte nerviosa compuesta por cinco clases neuronales principales, las células de sostén que proporcionan soporte metabólico y homeostático al conjunto y una monocapa de células epiteliales pigmentadas que constituyen el epitelio pigmentario de la retina (25,26). Atendiendo a la función que cada tipo celular desempeña en la retina, podemos clasificarlos en cinco grupos principales, distribuidos en capas identificables a microscopía óptica:

1. Células epiteliales pigmentadas del epitelio pigmentario de la retina.
2. Fotorreceptores: los conos y bastones de la retina.
3. Neuronas de conducción: células bipolares y ganglionares.
4. Neuronas de asociación: células horizontales y amacrinas.
5. Células de sostén: células de Müller, microglía y astrocitos.

2.1.1 Epitelio pigmentario de la retina.

Está formado por una monocapa de células epiteliales cuboides y pigmentadas que cubren la pared interna del globo ocular. La membrana apical del epitelio pigmentario está orientada hacia los segmentos exteriores de los fotorreceptores y contiene numerosas microvellosidades apicales largas que rodean a los conos y bastones, mientras que su membrana basolateral está recubierta por los capilares fenestrados de la coroides, contactando con la coroides a través de la membrana de Bruch (27,28). Su polaridad celular y posición específica le permiten realizar una multitud de funciones que resultan esenciales para la función visual (26,27) (Figura 3), entre las que destacan:

1. Producción y acumulación de gránulos de pigmento en el interior de melanosomas. Los melanosomas son los responsables de “apagar” el exceso de luz, impidiendo la reflexión de los haces luminosos y permitiendo el contraste normal entre puntos claros y oscuros necesario para la formación de una imagen precisa (26,27,29).
2. Transporte de moléculas desde la coroides hacia la retina, como glucosa, ácidos grasos y el retinol, que los entrega a los fotorreceptores. También participa del movimiento de agua y otros componentes, impidiendo su acumulación en el interior de la cavidad vítrea. Por otro lado, alberga grandes cantidades de vitamina A, la cual es intercambiada de manera continua con los segmentos externos de los fotorreceptores (30).
3. Mantiene la excitabilidad de los fotorreceptores. Los fotorreceptores son incapaces de reisomerizar todo el trans-retinal formado después de la absorción del fotón, de manera que, para mantener la excitabilidad de estos, la retina transporta el trans-retinal a las células del epitelio pigmentario y, una vez reisomerizado a 11-cis-retinal, viaja nuevamente a los fotorreceptores para comenzar un nuevo ciclo de excitación. Además, la conductancia iónica dependiente del voltaje de la membrana apical permite al epitelio pigmentario estabilizar la composición iónica del espacio subretiniano, esencial para mantener la excitabilidad de estos (26,31).

4. Fagocitosis de los segmentos externos de los fotorreceptores a través de las extensiones de la membrana apical, que rodean e interactúan con los fotorreceptores. En este sentido, la dependencia del fotorreceptor del epitelio pigmentario es tal que pueden considerarse como una sola unidad funcional de manera que una anomalía en el funcionamiento del epitelio pigmentario conducirá inexorablemente al aumento de la vulnerabilidad de los fotorreceptores (32,33).
5. Es el principal componente de la barrera hematorretiniana, participando del privilegio inmune del ojo (21,26).

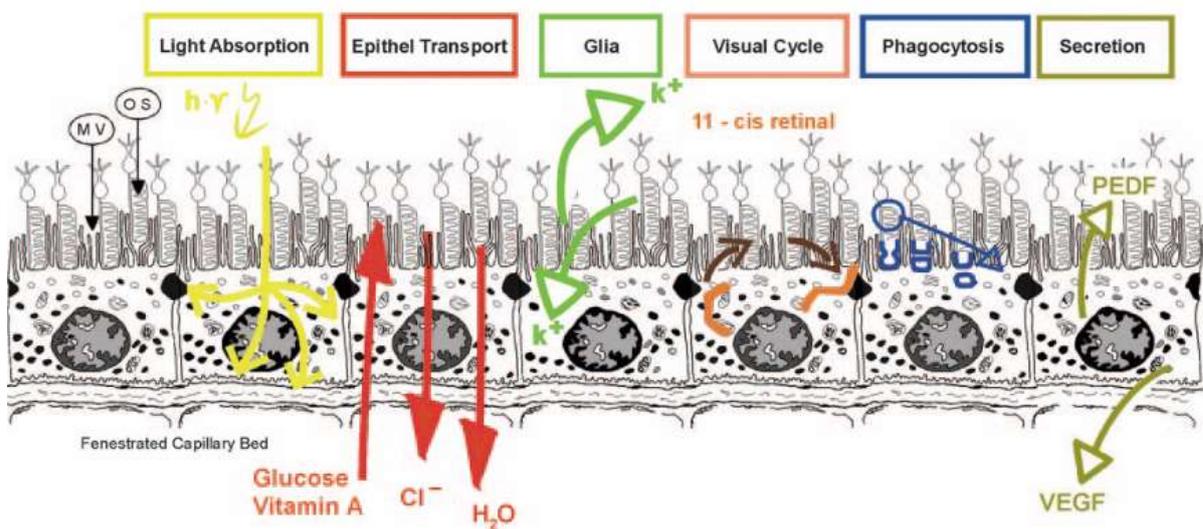


Figura 1: Esquema general de las funciones del Epitelio Pigmentario de la Retina. Modificado de (26).

2.1.2 Capa de fotorreceptores

Las células fotorreceptoras de los vertebrados deben ser capaces de captar fotones y convertir las señales luminosas en cambios del potencial de membrana y transmitir esta información codificada a las neuronas posteriores. Las células encargadas de realizar esta función son los conos y los bastones (34–37). Con un ratio de 20:1 de bastones frente a conos, los bastones se concentran en las regiones periféricas de la retina, mientras que los conos predominan en la región central (38). Ambos tipos celulares son neuronas sensoriales que contienen una arquitectura muy elaborada en la que destaca la presencia de cientos de discos membranosos sensibles a la luz en el segmento externo de estas células. Estos discos apilados capturan la luz e inician una cadena de eventos moleculares y celulares que subyacen a la visión (39,40).

Los conos y los bastones presentan diferencias a nivel estructural, funcional, en la sensibilidad a la luz, de cinética de respuesta y rango de adaptación (39). Todas estas diferencias se pueden

atribuir a las diferencias estructurales de los segmentos externos de ambos tipos celulares (Figura 4). Los bastones son mucho más sensibles a los estímulos luminosos que los conos, pudiendo ser excitados tan solo por un solo fotón, resultando idóneos para las condiciones de baja iluminación. Por su parte, los conos son menos sensibles y necesitan de una intensidad lumínica mayor para poder ser excitados y funcionan con la luz brillante, teniendo una mayor agudeza visual que los bastones (40,41).

2.1.2.1 Anatomía de los fotorreceptores.

De forma general, la anatomía de conos y bastones se puede dividir en cuatro partes principales: segmento externo, segmento interno, cuerpo celular y terminal sináptica. Esta organización ha sido ampliamente mantenida en prácticamente todos los vertebrados, aunque existen algunas diferencias en cuanto al número, tipo y tamaño de los mismos (37).

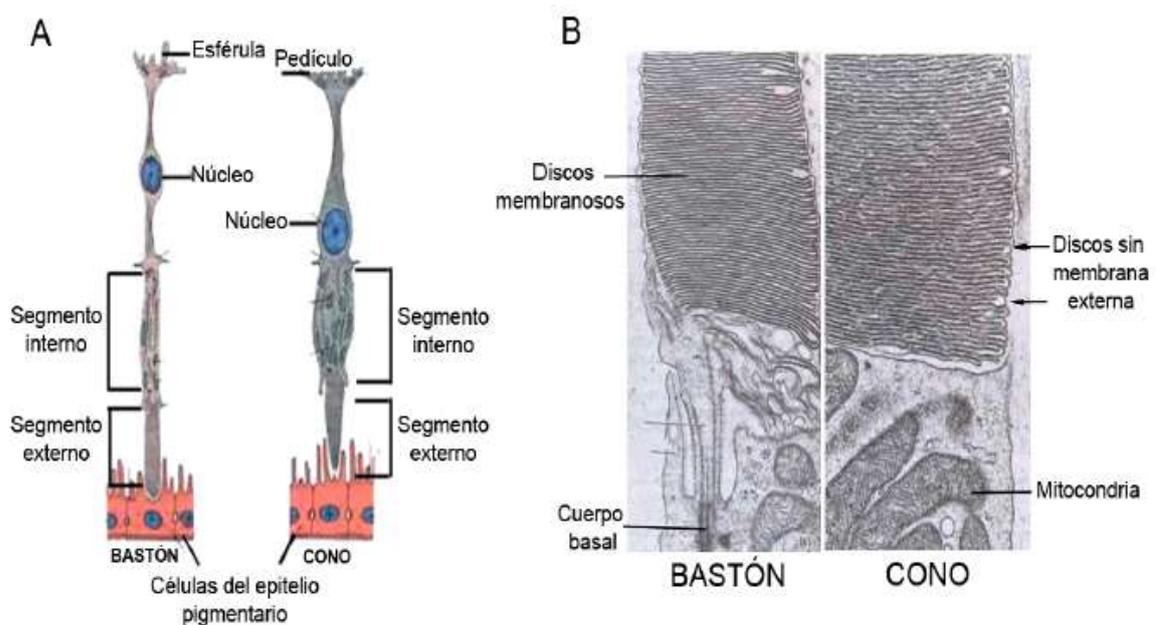


Figura 2: Esquema general de A) anatomía de conos y bastones con B) detalle ultraestructural de los segmentos externo e interno de cada tipo de fotorreceptor. Adaptado de Ross, 2013.

1. **El segmento externo:** constituye la porción del fotorreceptor sensible a la luz, cuya morfología puede ser cónica o cilíndrica dependiendo de si se trata de un cono o un bastón respectivamente. Consisten en una pila de discos membranosos altamente empaquetados formados por invaginaciones transversales de la membrana plasmática en cuyo interior se almacenan los pigmentos visuales encargados de la fototransducción. En los bastones, los discos están limitados por la membrana

plasmática, perdiendo su continuidad con ella, mientras que en los conos sí retienen esta continuidad (Figura 4B).

El segmento externo de los fotorreceptores contiene una alta cantidad de moléculas fotosensibles, lo que conduce a la acumulación de proteínas y lípidos dañados por fotooxidación. Por ello, la concentración de sustancias tóxicas en el interior de los fotorreceptores tras la exposición a la luz aumenta. La transducción visual depende de la correcta estructura y función de las proteínas que participan en el proceso. Para mantener la excitabilidad de los fotorreceptores, los segmentos exteriores son continuamente renovados (37). A través del desprendimiento coordinado del extremo del segmento y de la formación de nuevos discos en la zona basal, se mantiene la longitud del segmento externo constante. Estos discos desprendidos son fagocitados posteriormente por las células del epitelio pigmentario. Esta interacción es esencial para mantener la integridad estructural de los fotorreceptores (30,41).

2. **Segmento interno:** es la porción del fotorreceptor que contiene el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi, orgánulos donde tiene lugar la síntesis de los componentes proteicos y lipídicos, que son enviados al segmento externo a través del cilio de conexión. También está lleno de mitocondrias, localizadas adyacentes al segmento externo, que satisfacen las enormes demandas energéticas asociadas a la fototransducción, que tiene lugar en el segmento externo (37,39).
3. **El cuerpo celular,** que contiene el núcleo.
4. **Terminales sinápticas:** de morfología redondeada en los bastones y triangular en los conos, es la porción del fotorreceptor que establece sinapsis con las células bipolares y horizontales para transmitir la información visual en su camino hacia los centros visuales (Fu and Yau, 2007). En su interior contiene una gran cantidad de vesículas en donde se almacenan los neurotransmisores (37,41).

2.1.3 Membrana limitante externa

Delgada membrana constituida por una hilera de zónulas adherentes entre el extremo apical de las células de Müller y los fotorreceptores. Su función es la de actuar como barrera metabólica para limitar la libre difusión de moléculas hacia las capas profundas de la retina (42).

2.1.4 Capa nuclear interna

Capa de la retina en la que se localizan los núcleos de las células bipolares (41%), horizontales (3,1%), amacrinas (39%) y células de Müller (16%). Todos estos tipos celulares juegan un papel importante en el procesamiento visual temprano (43).

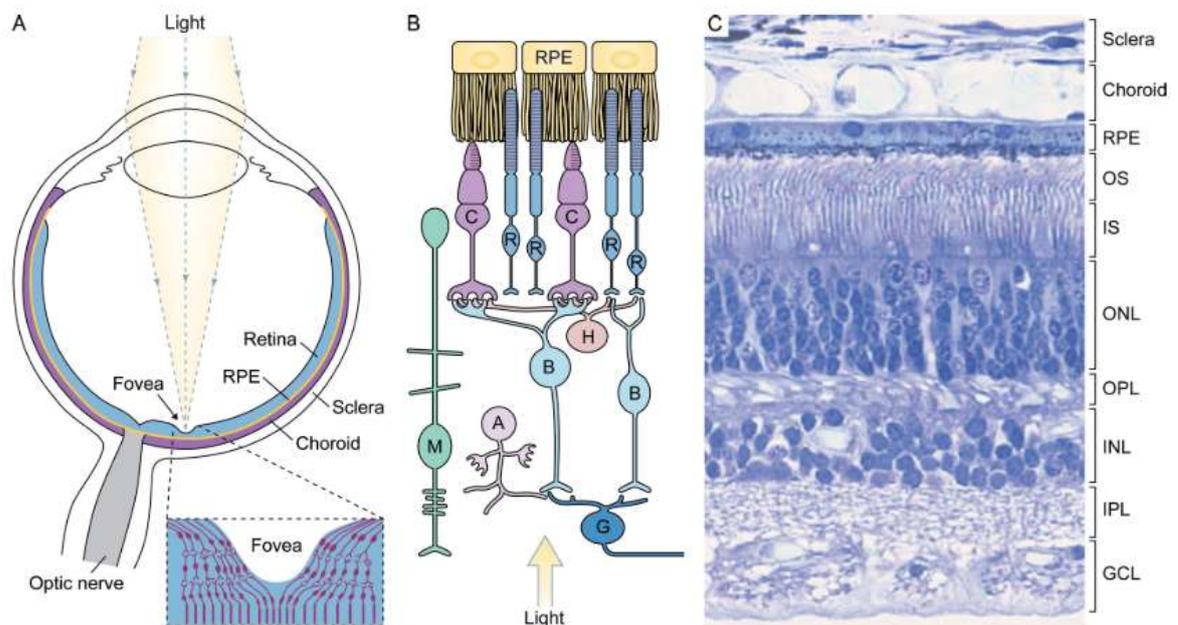


Figura 3: Esquema de los tipos celulares que conforman la retina. Las letras mayúsculas se corresponden con los tipos celulares; C, conos; R, bastones; M, células de Müller; A, células amacrinas; B, células bipolares; H, células horizontales; G, células ganglionares. Adaptado de (44).

1. **Células bipolares:** neuronas de conducción que transmiten la información recibida de los fotorreceptores hacia las células ganglionares y amacrinas. La mayoría de estas células no disparan potenciales de acción sino que responden a los estímulos luminosos con pequeños cambios graduados en el potencial de membrana (45). A través de sus dendritas contactan con los conos y bastones a nivel de la capa plexiforme externa y, a través de su axón, en la capa plexiforme interna establecen sinapsis con las células amacrinas y ganglionares (46,47). Se han descrito hasta 15 subtipos diferentes de células bipolares en ratón, estableciendo dos grupos dependiendo de si hacen sinapsis con conos o con bastones (46). La señal evocada por la luz en los fotorreceptores es recibida

de manera diferente por los subtipos de células bipolares. Algunas células bipolares expresan receptores ionotrópicos de glutamato (típicamente AMPA) y sufren despolarización ante la liberación continua de glutamato desde los fotorreceptores en condiciones de oscuridad (células bipolares tipo OFF). Cuando los incrementos de luz disminuyen la liberación de glutamato desde los fotorreceptores, estas células bipolares se hiperpolarizan y, por lo tanto, se las denomina células bipolares tipo ON (45).

2. **Células horizontales:** neuronas de asociación que establecen sinapsis tanto con los fotorreceptores como con las células bipolares en la capa plexiforme externa. Dependiendo de la ausencia de axón o presencia de axón corto se clasifican en células horizontales tipo A y B respectivamente. Ambos tipos son neuronas gabaérgicas de interconexión lateral que modulan la información de salida de los fotorreceptores y juegan muchos papeles en el procesamiento visual temprano contribuyendo a mejorar el contraste, la generación de campos visuales y los de patrones de color/ oscuridad (43,48,49). Estudios recientes sugieren que las células horizontales pueden actuar también a una escala mucho más pequeña, entre una única célula dendrítica y un terminal axónico de un fotorreceptor, desempeñando funciones en el procesamiento visual a nivel local y global simultáneamente (48,50).

3. **Células amacrinas:** llamadas así por Santiago Ramón y Cajal debido a su morfología “sin fibra larga”, la mayoría de las células amacrinas carecen de axón, reciben los estímulos excitatorios de las células bipolares y establecen sinapsis con las dendritas de las células ganglionares así como inhibición lateral con otras células amacrinas (43,45). Los cerca de 30 tipos de células amacrinas (51) dan forma a las características espacio-temporales de los campos receptivos de las células bipolares y ganglionares y enriquecen la diversidad y el contenido de información de las señales visuales en la retina interna (45,52). Una característica importante de las células amacrinas es su capacidad de liberar GABA o glicina (neurotransmisores que ejercen efectos inhibitorios y excitatorios respectivamente) y, al menor, otro neurotransmisor (acetilcolina o glutamato), permitiendo que células individuales jueguen múltiples roles en el procesamiento visual (52).

2.1.5 Capa de células ganglionares

Las células ganglionares son las neuronas de salida de la retina y envían la información visual a través de sus axones por el nervio óptico a los centros superiores en el cerebro (45). La distancia total recorrida por las células ganglionares de la retina comienza en las sinapsis con las células bipolares y amacrinas hasta las sinapsis cerebrales con las neuronas en el núcleo geniculado lateral. Anatómicamente están formadas por un árbol dendrítico que establece sinapsis con las células bipolares y amacrinas; un cuerpo celular; un axón no mielinizado, que incluye porciones intraoculares y de la cabeza del nervio óptico; un axón mielinizado, que incluye porciones intraorbitarias e intracraneales (53). Son precisamente sus axones los que conforman el nervio óptico.

La retina humana contiene tan solo un millón de células ganglionares mientras que hay más de cien millones de fotorreceptores. Esta diferencia notable en la cantidad de ambos tipos celulares fuerza a una estructura organizativa especial. En regiones periféricas de la retina, una sola célula ganglionar pueda establecer sinapsis con hasta un centenar de células bipolares. Por el contrario, en la mácula lútea que rodea a la fovea (la región de mayor agudeza visual), cada célula bipolar establece sinapsis con una sola célula ganglionar, generando una imagen punto por punto desde la fovea al cerebro (54,55).

El procesamiento visual comienza en la retina. Los fotorreceptores transmiten las señales luminosas a las células bipolares que, a su vez, la transmiten a las células ganglionares. Cada tipo de célula ganglionar extrae características especiales de la escena visual y la trasmite al cerebro. Estudios iniciales clasificaron las células ganglionares en ON, OFF y ON-OFF basándose en la respuesta a la estimulación con luz. Estos estudios también identificaron tipos de células ganglionares específicos para la detección de movimiento e iluminación constante. Según esta clasificación, las células ganglionares miden diferencias dentro de los campos receptores por comparación del grado de iluminación entre el centro y la periferia de la célula. De esta manera, en los campos receptores de centro ON, la luz produce la respuesta más fuerte si incide en el centro, mientras que para su inhibición la luz tiene que incidir en la periferia. Por su parte, las células ganglionares de centro OFF tienen la organización contraria, estimulándose cuando la luz incide en la periferia mientras que presentan inhibición cuando la luz incide en la zona central (54).

El descubrimiento reciente de un tercer tipo de fotorreceptores en la retina de los mamíferos (56), las células ganglionares intrínsecamente fotosensibles (ipRGC) ha tenido un gran impacto pues permite explicar adecuadamente numerosas funciones de la luz no relacionadas con la

visión, incluida su influencia sobre el ritmo circadiano y en la regulación del reflejo pupilar (57). Este tipo especial de células ganglionares contienen melanopsina, un pigmento que, aunque menos sensible que los pigmentos de los conos o bastones, dota a las células ganglionares de la capacidad de responder directamente a la luz, incluso en ausencia de conos y bastones (56,58).

2.1.6 Membrana limitante interna.

Es una fina capa constituida por la lámina basal de las células de Müller (el extremo apical de estas células conforma la membrana limitante externa) y separa la retina del espacio intravítreo.

2.1.6.1 Células gliales de la retina.

La retina de los vertebrados contiene cuatro tipos principales de células gliales: los astrocitos, las células de Müller, la microglía residente y un cuarto tipo, los oligodendrocitos, los cuáles se han visto en la retina asociados a axones de células ganglionares mielinizadas. Todos los tipos celulares están destinados a mantener la homeostasis retiniana, brindar soporte estructural, la fagocitosis de los desechos neuronales, la liberación de ciertos transmisores y factores tróficos, así como la absorción de potasio, etc. (59,60). De todos ellos, las células de Müller son el elemento glial predominante, representando el 90% de la glía retiniana. Morfológicamente son células que atraviesan la retina desde su borde interno (límite con la cámara vítrea) hasta el extremo distal de la capa nuclear externa.

Las células de Müller están involucradas en la organización estructural de la barrera hematorretiniana. Los capilares sanguíneos están envueltos por las células de Müller, que actúan como un sistema de comunicación para el intercambio metabólico entre la vasculatura y las neuronas, de una manera análoga a la que se postula para los astrocitos en el cerebro (59). Sin embargo, la estrecha asociación física entre los procesos de las células de Müller y los vasos retinianos deja abierta la posibilidad de que las células de Müller *per se* sean componentes esenciales de la barrera hematorretiniana y, como tal, influir de manera directa en su propia permeabilidad (61,62).

3. Miopía.

3.1 Prevalencia, distribución y fisiopatología de la enfermedad.

La miopía es un problema médico y un problema óptico de desenfoque debido a un desajuste entre la longitud axial del globo ocular y las lentes que lo componen que determina que la luz se enfoque delante de la retina y, como consecuencia, los objetos distantes aparecen borrosos (63,64). La miopía ha demostrado un significativo aumento de la prevalencia en las últimas décadas, convirtiéndose en uno de los principales trastornos oculares que causan discapacidad visual en todo el mundo. Actualmente, entre el 30-50% de los adultos en EE.UU. y Europa son miopes, condición que es mucho más frecuente en los países asiáticos en los que llega a afectar hasta al 90% de los estudiantes de secundaria (65–68). Siguiendo las tendencias actuales, se espera que su prevalencia aumente de las 1400 millones de personas actuales a 5000 millones para 2050 (aproximadamente el 50% de la población mundial) de las cuáles, el 10% padecerá la variedad de miopía alta (67,69–73).

A pesar de que los síntomas refractarios de la miopía pueden aliviarse con gafas y lentillas o cirugía, el riesgo de complicaciones como el desprendimiento de retina, glaucoma y degeneración macular aumenta en la variedad de miopía alta y pueden conducir a la pérdida irreversible de visión (66).

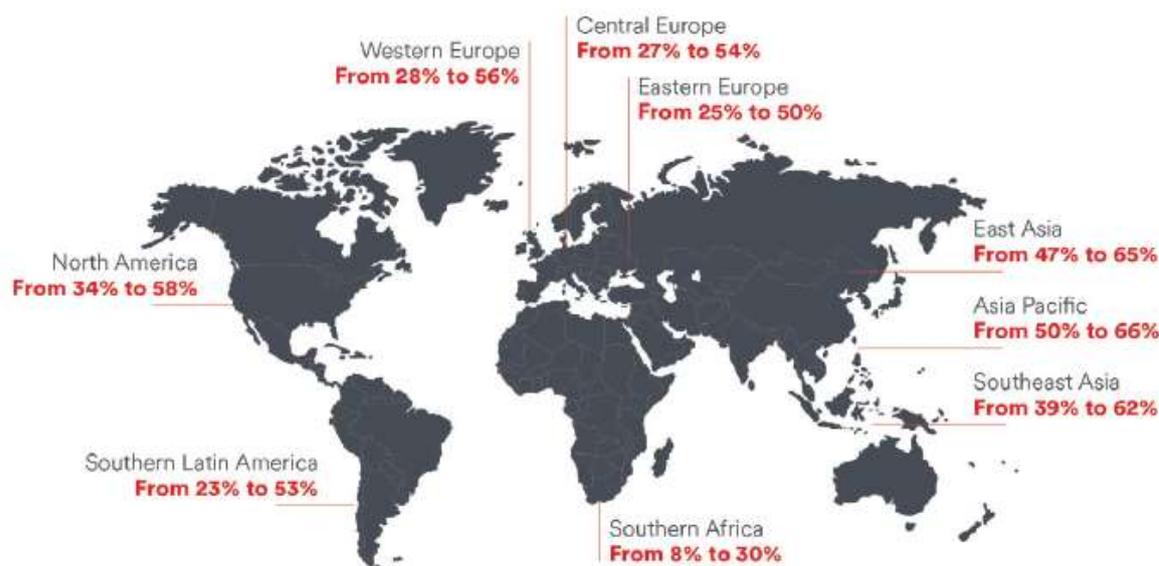


Figura 4: Mapa geográfico de prevalencia de miopía. Adaptado de (74).

3.2 Predisposición genética e interacciones genético-ambientales de la miopía.

Todos los modelos animales, así como las observaciones realizadas en humanos parecen apoyar la premisa de que el desarrollo de miopía está promovida por una compleja interacción entre factores genéticos y ambientales (63,66,75). Hasta la fecha se han realizado numerosos estudios destinados a identificar y comprender el funcionamiento de los genes involucrados en el desarrollo del estado refractario basal y de los genes de susceptibilidad a miopía. Estos estudios han identificado más de 100 genes y 20 cromosomas asociados al desarrollo de miopía (76–79). Los cambios en los niveles de expresión génica involucran a la retina, coroides y esclera (80–83).

Sin embargo, al analizar poblaciones diferentes solo algunos de estos genes están presentes y, además, tienden a ejercer pequeños efectos que típicamente representan tan solo una pequeña proporción de la miopía (84). Por ello y a pesar de su gran importancia, estos estudios no explican con claridad el fenómeno subyacente al desarrollo de miopía en su totalidad, haciendo necesaria la existencia de un fuerte componente ambiental (79,84–87). En este sentido, las poblaciones afectadas podrían responder a diversos factores externos tales como el incremento de la presión educativa, el incremento de la ingesta de hidratos de carbono (88), así como la disminución de la exposición a la luz solar, los cuáles podrían estar asociados con el aumento de la prevalencia global de miopía (65,85,89,90).

En conclusión, el impacto de dichos factores ambientales viene determinado por variaciones en los “genes de susceptibilidad”, de manera que es necesario la existencia de un fondo genético que predisponga a padecer esta enfermedad y sobre el que ejercen su efecto los factores ambientales (63,64,89,91–93).

3.3 Miopía baja, normal o leve.

El estado refractario ocular es una variable compleja, determinada por el equilibrio del poder óptico de la córnea, el cristalino y la longitud axial del globo ocular (94). Durante el desarrollo ocular postnatal la experiencia visual se ajusta a un programa genético de crecimiento ocular, haciendo que la potencia óptica del ojo y su longitud axial permitan la formación de imágenes sobre la retina en un proceso llamado emetropización (85). La incapacidad para lograr o mantener la emetropía conduce al desarrollo de errores de refracción (hipermetropía y miopía). En la miopía, el alargamiento axial de globo ocular impide que la imagen se forme correctamente

sobre la retina, produciendo una visión borrosa de los objetos situados a cierta distancia del observador.

Tradicionalmente, se han definido dos variedades de miopía: la miopía baja y alta. La miopía normal (NM), leve o moderada se define por un defecto refractario inferior a las seis dioptrías y a una longitud axial del globo ocular menor de 26mm. Valores superiores definen la miopía alta, magna o degenerativa y predisponen al paciente a sufrir una serie de complicaciones derivadas por lo que será abordada en esta tesis como una patología diferente (95).

4. Miopía alta, magna o degenerativa.

La miopía alta (HM), magna, degenerativa o maligna se caracteriza por un defecto refractario superior a seis dioptrías y a una longitud axial del globo ocular superior a 26mm (95). Mientras que la miopía leve generalmente se estabiliza a lo largo de la segunda o tercera década de vida sin cambios patológicos en la retina, en la miopía alta la estructura ocular experimenta un cambio progresivo durante toda la vida del paciente que incluye el estiramiento de la pared ocular, el debilitamiento de la pared escleral y adelgazamiento coroideo y cambios degenerativos de la retina y la coroides, neovascularización coroidea y atrofia de los tejidos posteriores (70). Por ello, no solamente se trata de una miopía baja con más dioptrías, sino de una patología con una etiología y evolución diferentes y de gran impacto en la sociedad cuyo mecanismo director permanece todavía desconocido.

Nuestra comprensión de las bases anatómicas de la patología miope ha mejorado sustancialmente con la aplicación de técnicas avanzadas de diagnóstico por imágenes como la tomografía de coherencia óptica (OCT) o la resonancia magnética (RM) (96–99). Toda la miopía es causada por un alargamiento excesivo del ojo, pero los ojos que padecen miopía patológica no son simplemente alargados, sino que también están severamente deformados. La presencia de maculopatía miope implica cambios en la esclerótica, la coroides y el campo visual (95,100,101). Por ello, la maculopatía miópica se emplea para definir la miopía patológica, incluyendo los signos específicos de miopía alta: estafiloma posterior, estrías lacadas, mancha de Fuchs, adelgazamiento coriorretiniano y neovascularización coroidea (95). La elongación del globo ocular contribuye significativamente al desarrollo de la maculopatía miope. Sin embargo, no todos los ojos con una longitud axial mayor desarrollan dicha maculopatía ni se puede predecir qué ojos la desarrollarán y cuáles no (102). Además, existen problemas asociados con las diferentes definiciones de miopía y signos de la miopía patológica, puesto que en el rango de

miopía de leve a moderado se observan pocos signos patológicos, aunque dichos signos aumentan considerablemente con la miopía superior a $-6D$, así como con la edad (11).

Todo ello hace necesario el establecimiento de una definición global de la miopía alta, que identifique los patrones moleculares que la dirigen y que la diferencian de la miopía normal, con el fin de poder entender su desarrollo y evolución.

4.1 Regulación del crecimiento ocular y miopía alta.

Durante el desarrollo de los organismos, la mayor parte del cuerpo mantiene su forma y tamaño, creciendo o decreciendo según sea necesario. Podemos encontrar ejemplos variados de este proceso homeostático de control del crecimiento en todo el mundo natural; el pez payaso regula su tamaño corporal en función de su estatus social dentro del grupo; las serpientes, cuyos hábitos alimenticios les permiten comer solo ocasionalmente, cambian dramáticamente el tamaño de sus intestinos, riñones, páncreas, estómago e hígado tras una ingesta, decreciendo su tamaño cuando el alimento es digerido. En todos estos casos, los mecanismos homeostáticos de control del crecimiento causan cambios dramáticos en el control del crecimiento (103).

Por su parte, el ojo debe responder a un desafío notable. Su longitud axial debe permitir enfocar la imagen sobre la retina. Cuando la imagen no es enfocada de manera correcta sobre la retina, se producen errores de refracción que pueden ser hiperópicos o miópicos ante los cuáles el ojo responde cambiando su profundidad en un proceso llamado emetropización (104). En él, la experiencia visual guía el crecimiento ocular de forma que, si el aparato ocular del ojo enfoca la imagen antes o después de la retina, el ojo compensa dichos errores reduciendo su crecimiento axial o acelerándolo.

De esta manera, se asume que hay dos mecanismos de control del crecimiento: una regulación activa no dependiente de señales externas que regula el crecimiento del ojo de manera similar al de cualquier órgano y otra, específica del ojo, dependiente de la experiencia visual (92,103,105).

4.1.1 Control local del crecimiento ocular: la experiencia visual.

En los casos en los que la profundidad del ojo y la potencia de las lentes del sistema ocular están desajustados, la imagen generada es borrosa, lo cual es percibido por los fotorreceptores retinianos. Cuando esto sucede, el ojo trata de compensar este desenfoque por medio de la acomodación y la emetropización. Ambos procesos responden a un desafío similar: cómo

reconocer el signo del desenfoque. Los estudios realizados hasta la fecha con modelos animales sugieren que el ojo es capaz de inferir por sí mismo el signo del desenfoque (103,106).

La señal más prometedora para conocer el signo del desenfoque parece ser la aberración cromática del ojo. En el caso de un ojo emétrepe, la imagen se genera sobre la retina y la longitud de onda del azul está situada antes de la retina y la del rojo detrás de esta. Si el ojo es miope (más largo de lo habitual), la longitud de onda correspondiente al rojo estará situada sobre la retina, permaneciendo el azul por delante de esta y en una situación de desenfoque. Por el contrario, cuando el error de refracción es hiperópico, ocurre el proceso inverso. El enfoque diferencial de ambas longitudes de onda permite a las células de la retina inferir por sí mismas el signo del desenfoque ocular.

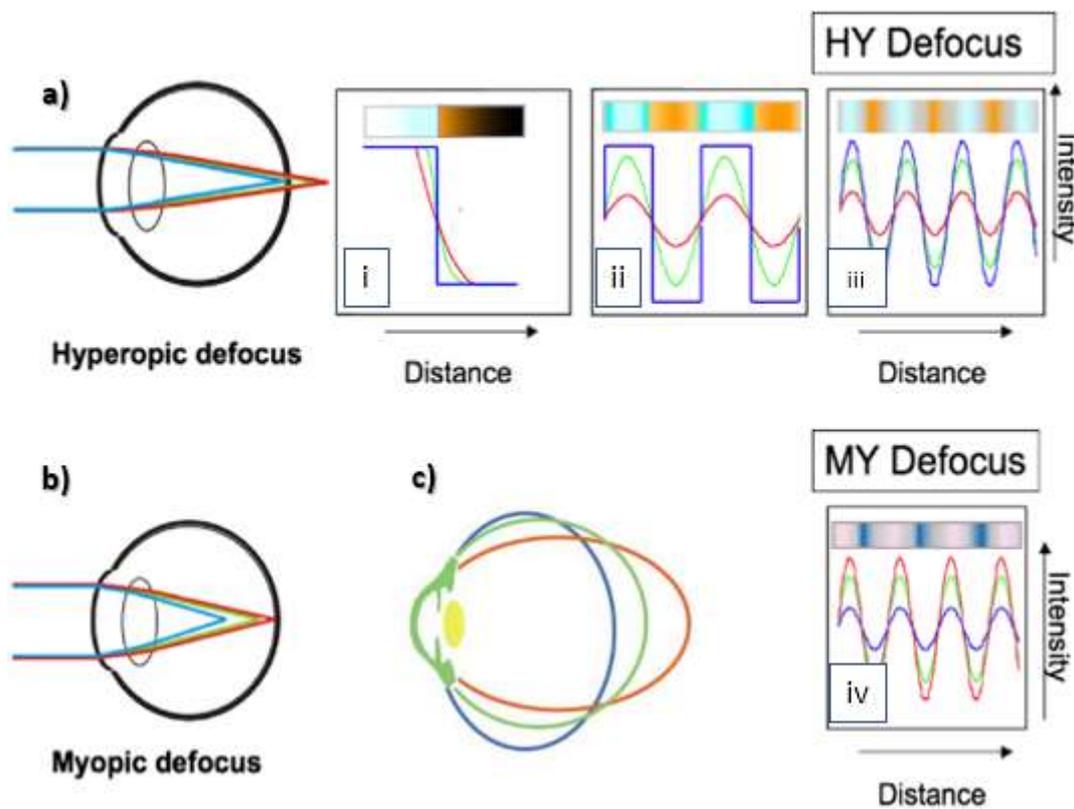


Figura 5: Diagrama de los múltiples planos de enfoque de un ojo hipermetrópico (parte superior de la imagen) y miópico (parte inferior). En el caso de un ojo hipermetrópico, las longitudes de onda más cortas (azules) están enfocadas más fuertemente que las medias (verdes) o largas (rojas). Por su parte, en un ojo miope, son las longitudes de onda largas (rojas) las que están enfocadas (103,107).

Una vez que la retina reconoce el signo del desenfoque, es necesario una comunicación entre la retina y los tejidos posteriores (coroides y esclera) que permitan desplazar la retina hacia atrás, favoreciendo que el ojo se estire y alargue posteriormente hasta que la imagen se forme correctamente sobre la retina. En este proceso intervienen diferentes neurotransmisores, factores de crecimiento e interleucinas específicas del crecimiento ocular(103).

4.1.1.1 Neurotransmisores y factores de crecimiento involucrados en el crecimiento ocular.

Aunque los mecanismos neuronales por medio de los cuáles la retina procesa la imagen y se comunica con la coroides y la esclera todavía permanecen desconocidos, el desarrollo de modelos animales ha incrementado notablemente nuestro conocimiento acerca de la regulación del crecimiento ocular y la implicación que los diversos factores de crecimiento tienen en este proceso. En estos modelos se han descrito una serie de moléculas candidatas de regular el crecimiento actuando sobre el epitelio pigmentario, la coroides y la esclera (87). Entre las moléculas secretadas por la retina y que viajan hacia los tejidos posteriores destacamos la dopamina, el glutamato y la acetilcolina (108).

Además de la retina, en el crecimiento ocular juega un papel clave el epitelio pigmentario de la retina (109), tanto por su localización como por ser la fuente de numerosos factores de crecimiento y citoquinas tales como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor de crecimiento transformante ($TGF\beta$), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y el factor de crecimiento tipo insulina (IGF).

Junto con el epitelio pigmentario, la coroides también participa en el proceso de síntesis y secreción de señales que viajan posteriormente hacia la esclera. Entre estas moléculas sintetizadas destacan el activador de plasminógeno tisular (t-PA) y las metaloproteasas de la matriz (MMP), que desempeñan un papel fundamental en el remodelamiento escleral, actuando sobre las fibras de colágeno y favoreciendo, en última instancia, la elongación del globo ocular. Analizando con mayor detalle la contribución de cada una de las moléculas involucradas en el proceso y ordenándolas según el tejido del que proceden, destacamos:

4.1.1.1.1 Liberados desde la retina.

- **Dopamina:** la dopamina retiniana se sintetiza y libera desde las células amacrinas e interplexiformes (110) a partir del aminoácido tirosina en dos pasos: primero la L-tirosina se convierte en 3,4- dihidroxi-L-fenilalanina (L-DOPA) por medio de la tiroxina hidroxilasa (TH) y, en un segundo paso, la L-DOPA se convierte en dopamina (DA) por medio de la DOPA descarboxilasa (111). La dopamina recién sintetizada es transportada en vesículas sinápticas por el transportador VMAT2. La principal señal para la síntesis de dopamina es la luz, con una activación concomitante de tiroxina hidroxilasa que mantiene las reservas de dopamina en estado estacionario bajo condiciones de actividad neuronal (112). Cuando la dopamina se libera desde las células amacrinas,

actúa sobre los receptores presinápticos y postsinápticos y, finalmente, es transportada de vuelta a las neuronas dopaminérgicas por el transportador específico de dopamina (DAT). Una vez dentro de la célula puede volver a ser empaquetada en vesículas o metabolizada por la monoaminoxidasa para volver a formar el ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC), el metabolito primario de la dopamina en la retina.

La actividad de la dopamina se modula a través de sus receptores, localizados en casi todas las clases neuronales dentro de la retina. La retina expresa 4 de los 5 subtipos de receptores de la DA: D1R, D2R, D4R y D5R. Los receptores tipo D1 (D1R y D5R) estimulan la síntesis de AMPc intracelular, mientras que los receptores tipo D2 (D2R y D4R) inhiben su formación (112).

Los experimentos realizados en modelos animales parecen demostrar que la dopamina actúa como una señal de parada del crecimiento ocular (113), basado en la reducción de los niveles de DA y/o DOPAC retinianos y vítreos encontrados en primates, pollos y cerdos como respuesta a la privación de la visión y la colocación de lentes negativos (112,114). En ojos con privación de forma parcial, la DOPAC retiniana disminuye localmente solo en la región que ha sido privada (82) y vuelve a los valores normales después de la eliminación de los difusores en pollos (115,116).

Gran parte de los estudios destinados a conocer el papel de la dopamina en el desarrollo de miopía se centran en conocer el rol que desempeñan los receptores tipo D1 y D2 en este proceso (114). En general, estos estudios muestran que la activación de los receptores tipo D2 imitan el efecto protector de los periodos sin obstrucción en la visión en modelos de miopía por privación. En este sentido, es interesante destacar que los antagonistas de los receptores D2 no son suficientes para inducir miopía pero sí facilitan su desarrollo (117). Por su parte, la contribución de los receptores tipo D1R en el desarrollo de la miopía es menos claro, siendo necesario más estudios que aclaren su papel. La hipótesis general es que la activación de los receptores tipo D1 conduce a la hipermetropía, mientras que la activación de los receptores tipo D2 dirige al ojo hacia la miopía (Figura 8).

La activación de la retina por la luz conduce a cambios en la liberación de DA por la retina. La activación de los fotorreceptores excita a las células amacrinas dopaminérgicas, que a su vez aumentan el contenido retiniano de DA (118).

A nivel de la retina, la dopamina modula la conductancia de las uniones entre conos y bastones por medio de la activación de los receptores tipo D2, disminuyendo la actividad intracelular de AMP_c y la proteína quinasa A. Por tanto, en condiciones de baja iluminación y bajos niveles de dopamina, los fotorreceptores están firmemente

acoplados. Dado que la liberación de dopamina está regulada por la luz, la adaptación a la luz reduce el acoplamiento de las células horizontales y los tamaños de los campos receptivos, aumentando la agudeza visual con luz brillante. Por ello, es posible que la dopamina inhiba el crecimiento ocular porque reduce el tamaño del campo receptivo de la retina y simula una imagen bien enfocada sin necesidad de que el ojo se convierta en un ojo miope (119).

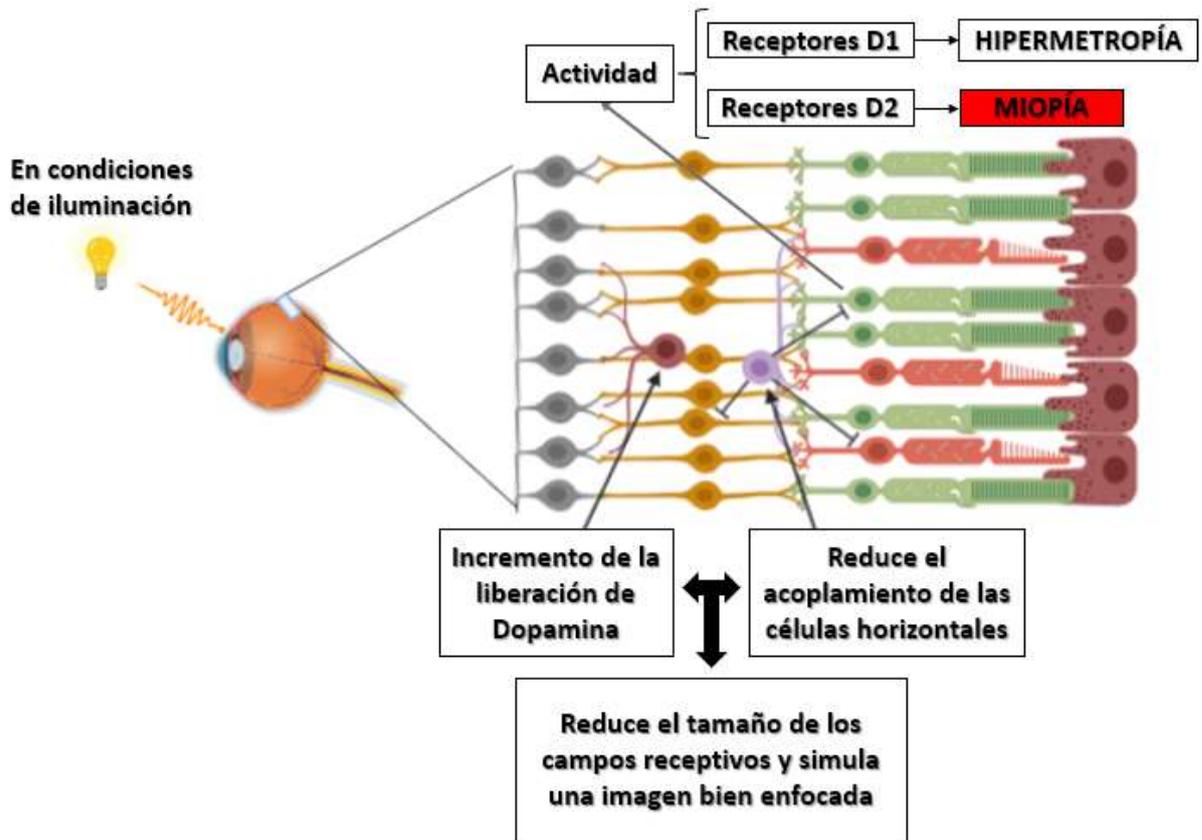


Figura 6: esquema del funcionamiento de la dopamina en la retina humana bajo condiciones de iluminación. El incremento de su síntesis y liberación por las células amacrinas reduce el tamaño de los campos receptivos al inducir un menor acoplamiento de las células horizontales, lo que simula una imagen bien enfocada en la retina sin necesidad de que el ojo se vuelva miope. Elaboración propia.

Recientemente se ha demostrado que los agonistas de la dopamina interactúan con la molécula de señalización temprana ZENK, que desencadena los primeros pasos en la regulación del crecimiento ocular. Sin embargo, dado que se necesitan largos periodos de tratamiento para inducir cambios significativos en la síntesis y liberación de dopamina en la retina, su contribución en los primeros compases de la miopía no está clara. En cualquier caso, la amplia distribución espacial de las células amacrinas dopaminérgicas en la retina y la observación de que los cambios en los niveles de dopamina pueden ser inducidos localmente por la privación local de la retina sugiere

que los mecanismos dopaminérgicos controlan el crecimiento ocular y que las células amacrinas no son secundarias sino que podrían mediar una señal inhibitoria para la elongación axial del ojo (119–121).

- **Glutamato y GABA:** el glutamato es el neurotransmisor excitador predominante en el SNC de los mamíferos (122) y ejerce sus funciones a través de una familia de 5 transportadores que median su absorción: GLAST, GLT-1, EAAC1, EAAT4 y EAAT5. El transportador EAAT5 es exclusivo de las células fotorreceptoras y las células bipolares de la retina, desempeñando un papel importante en la transmisión de la información visual(123).

El ácido γ -aminobutírico (GABA) es un neurotransmisor inhibitorio ampliamente distribuido en el sistema nervioso central y la retina que participa en la señalización tanto de células amacrinas como horizontales. En la retina, GABA colocaliza y/o interactúa en vías funcionales con la dopamina y la acetilcolina, todos ellos neurotransmisores implicados en la regulación del estado refractario (114,124).

Los receptores de GABA se han clasificado tradicionalmente en tres subtipos principales: GABA-A, GABA-B y GABA-C. Los receptores GABA-A y GABA-C consisten en canales de cloruro activados por ligando mientras que los receptores GABA-B son receptores metabotrópicos unidos a la proteína G y acoplados a adenilato ciclasa o a Ca^{2+} (125). Los receptores GABA-A se producen en los sitios pre y postsinápticos de muchos tipos de neuronas retinianas, aunque se encuentran principalmente en células bipolares. Por su parte, los receptores GABA-B tienden a localizarse postsinápticamente en las células amacrinas y ganglionares.

Los estudios realizados hasta la fecha sugieren que las células fotorreceptoras y las células bipolares liberan glutamato, mientras que las células horizontales y amacrinas reciben la información proveniente de estas células y proporcionan retroalimentación negativa hacia los fotorreceptores, participando en los circuitos retinianos a través de la vía lateral mediada por GABA. Por tanto, el equilibrio entre las señales excitatorias e inhibitorias de la retina es muy importante para el correcto procesamiento visual.

Durante el desarrollo normal del ojo, el ratio GABA/Glutamato se mantiene en equilibrio. Por su parte, durante el desarrollo de la miopía se rompe este equilibrio, bien mediante el incremento del contenido de GABA o bien mediante cambios en la expresión de moléculas relacionadas con GABA como la dopamina o el Cl^- (126). En este sentido, se han descrito aumentos significativos en los niveles de GABA en los ojos con

miopía inducida por privación, con una correlación positiva y alta entre los niveles de GABA y la longitud axial del globo ocular (126).

Teniendo en cuenta el papel central de la retina en la transmisión de la información visual, parece que las señales desencadenadas por la miopía proceden de señales anormales derivadas de la propia retina, las cuales deberán ser enviadas (o bien segundos mensajeros) hacia los tejidos posteriores, el EPR, la coroides y la esclera (127).

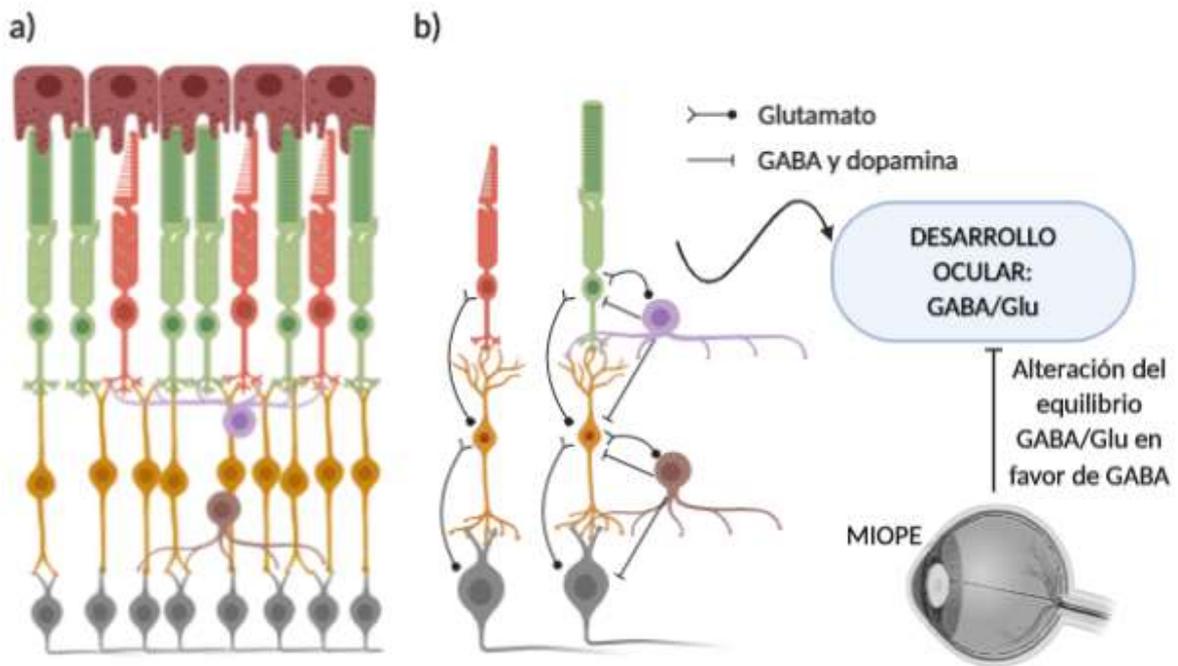


Figura 7: a) esquema general de la arquitectura retiniana y b) detalle de la comunicación intercelular a nivel retiniano establecida por sinapsis excitadoras mediadas por el glutamato, y las inhibitoras, mediadas por GABA y sus moléculas relacionadas como Dopamina y Cl⁻. Elaboración propia.

4.1.1.1.2 Liberados desde el Epitelio Pigmentario de la Retina.

El epitelio pigmentario de la retina es una importante fuente de citocinas y factores de crecimiento con funciones importantes en el mantenimiento de la integridad de la retina, el establecimiento del privilegio inmune y en la regulación temprana del crecimiento ocular (29,108). Todos ellos son sintetizados localmente y, posteriormente, secretados. Dependiendo de la dirección de esta secreción, pueden producir cambios en la retina o dirigirse posteriormente hacia la coroides y la esclera. Además, contiene numerosos receptores para las moléculas provenientes de la retina implicadas en la regulación del crecimiento ocular, tales como la dopamina, la acetilcolina y el glucagón. Además, el transporte transepitelial de iones o líquido a su través puede tener implicaciones en el control del grosor corioideo y escleral, tejidos diana de las señales que controlan el crecimiento ocular (128,129).

Entre los factores de crecimiento, destacan:

- **La familia de Factores de crecimiento endotelial vascular (VEGF):** la familia VEGF está formada por cinco homólogos (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D y VEGF-E) así como por un homólogo adicional, el factor de crecimiento placentario (PlGF). El VEGF-A es el componente principal. Esta familia de factores de crecimiento están encargados de la formación y el mantenimiento de la vasculatura coroidea y del suministro de oxígeno y nutrientes a las regiones exteriores de la retina. También proporciona soporte neurotrófico a los fotorreceptores, células bipolares y células ganglionares (Figura 10) (130).

VEGF estimula el desarrollo vascular a través de su receptor VEGFR2 (también conocido como FLK1) y activa a las células endoteliales inactivas que promueven la permeabilidad vascular a través del receptor VEGFR1. La célula endotelial sometida a mayores niveles de VEGF será escogida como “célula de punta” y dirigirá el brote del nuevo caso (131–133).

En pacientes con miopía, estudios recientes han demostrado incrementos en el ratio VEGF/PEDF, alteración que se acrecienta a medida que la patología progresa. Actualmente, el tratamiento intravítreo con anti-VEGF (Ranibizumab, Bevacizumab y Aflibercept) es el tratamiento estándar para enfermedades de la retina de tipo neovascular, como las membranas neovasculares en la miopía patológica o en la degeneración macular asociada a la edad y el edema macular en la oclusión de la vena retiniana o en la diabetes (134–137).

- **Familia de factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF):** para la estabilización de los vasos en formación, las células endoteliales liberan PDGFB, para quimioatraer a los pericitos que recubren el vaso, con el fin de evitar fugas, sangrado y microaneurismas (Figura 10). En la degeneración macular asociada a la miopía alta, los nuevos vasos formados son deficientes en su recubrimiento, lo que provoca fugas de líquido hacia el espacio vítreo, fomentando una mayor degeneración macular y estrés oxidativo (138–140).
- **Factor de crecimiento derivado del epitelio pigmentario (PEDF):** el PEDF es una glucoproteína de 50Kda perteneciente a la familia de inhibidores de la proteasa, sintetizado localmente por las células del epitelio pigmentario de la retina y que actúa como una potente señal antiangiogénica en los principales trastornos oculares, tales

como la degeneración macular asociada a la edad, la miopía patológica y la vasculitis coroidea polipoidea (141). Además de su función antiangiogénica, también desempeña un papel neurotrófico y neuroprotector, participando de la diferenciación y supervivencia retinianas (142,143).

Por todo ello, el balance de síntesis VEGF/PEDF por parte de las células del epitelio pigmentario es crucial para el correcto funcionamiento de la retina. En este sentido, en la miopía alta o patológica este balance VEGF/PEDF se desajusta, manteniendo una correlación directa con el grado de maculopatía desarrollado por el paciente (144). Además, otros factores como la propia actividad del sistema del complemento actúan sobre este sistema homeostático VEGF/PEDF, incrementando el ratio y fomentando un mayor grado de degeneración macular (141).

En las arteriolas retinianas, las células musculares lisas se orientan longitudinalmente, todas rodeadas por una membrana basal que contiene una cantidad creciente de colágeno a medida que nos desplazamos hacia la túnica externa (145). Por su parte, las células endoteliales, que componen la túnica interna, se orientan longitudinalmente a lo largo del eje del vaso y comparten su membrana basal con las células musculares lisas adyacentes y los pericitos. Esta membrana basal está formada por colágeno de tipo IV, fibronectina, laminina, metaloproteinasas y uroquinasa, esta última muy importante para el reclutamiento de agentes vasoactivos y de crecimiento endotelial (28).

Por su parte, los capilares consisten en un endotelio continuo y pericitos intramurales que se extienden longitudinalmente a lo largo del capilar (139). Ambos tipos celulares presentan comunicación directa a través de los complejos del intersticio (146) y comparten una membrana basal común. Además, los vasos de la retina contienen una proporción excepcionalmente elevada de pericitos respecto a las células endoteliales. Los microvasos retinianos no están fenestrados y poseen complejos de unión entre células endoteliales en la cara luminal. Estas uniones estrechas constituyen el componente central de la barrera hematorretiniana interna. Por su parte, las células del epitelio pigmentario de la retina, tal y como mencionamos anteriormente, constituyen la barrera hematoencefálica, que evita el libre tránsito de metabolitos desde los capilares fenestrados de la coriocapilar hacia la capa de fotorreceptores.

Todo el conjunto está envuelto por macroglía. La vasculatura retiniana superficial está cubierta por astrocitos y células de Müller, mientras que el plexo vascular profundo está rodeado únicamente por las células de Müller (147).

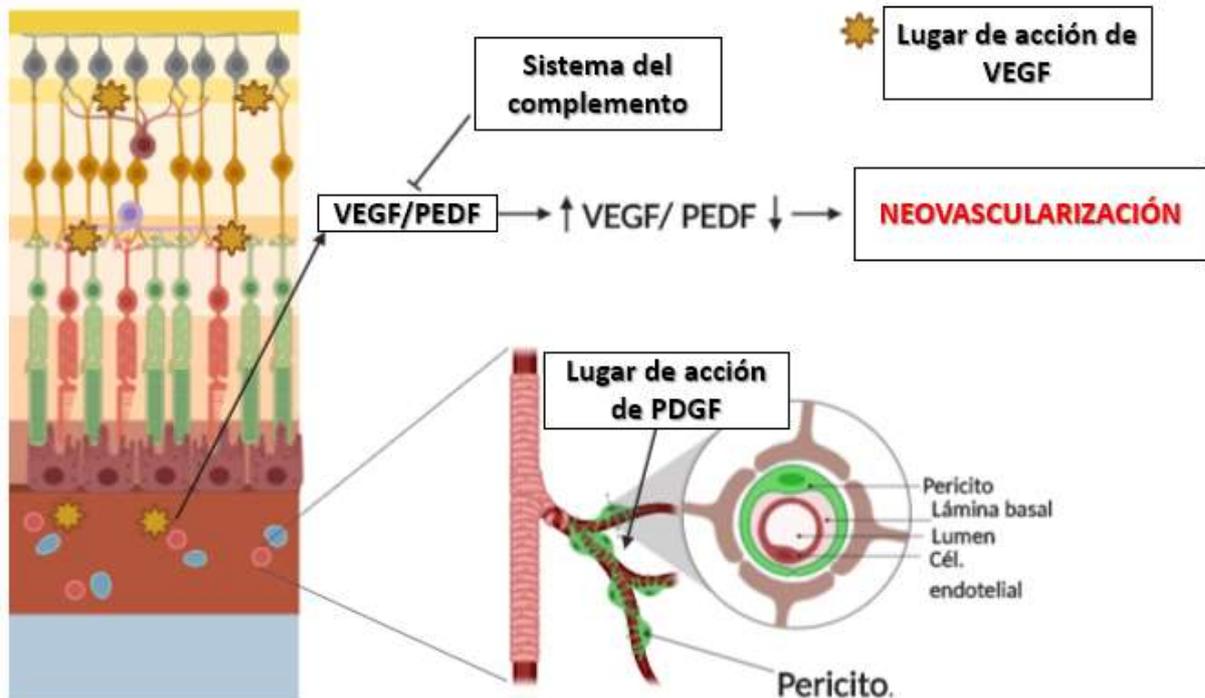


Figura 8: detalle de los lugares de acción de los factores de crecimiento endotelial vascular (VEGF), del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y del sistema del complemento sobre el equilibrio VEGF/PEDF. Elaboración propia.

- **Factor de crecimiento de fibroblastos (FGFs):** es una familia de factores de crecimiento que regulan una gran cantidad de procesos del desarrollo, incluyendo patrones cerebrales, morfogénesis y el desarrollo de extremidades (148). Esta gran familia está formada por 18 factores de crecimiento diferentes, la mayoría de ellos considerados como factores paracrinicos (a excepción del FGF-19, FGF-21 y FGF-23 que actúan de manera endocrina).

El FGF lleva sus funciones a cabo a través de su unión y activación con sus receptores FGFR, receptores tirosina quinasa dependientes de HSGAG localizados de forma ubicua en la retina y la esclera, lo que sugiere que puede actuar como un mediador de la señal retinoescleral (148,149).

La participación de FGF en la enfermedad humana está bien documentada. Su desregulación puede contribuir a condiciones patológicas ya sea a través de la ganancia o pérdida de función de sus receptores, favoreciendo la ramificación microvascular, así como cierta actividad antiapoptótica (150). En el ojo, cualquier cambio en el tamaño ocular puede conducir a la alteración del enfoque y este tamaño ocular viene determinado por las cubiertas externas del ojo, la coroides y la esclera. Los estudios en modelos animales han demostrado que la remodelación de la matriz extracelular de la

esclera facilita tanto el crecimiento ocular como el desarrollo de miopía (149). Los cambios en la regulación de la proliferación de las células esclerales, la síntesis de colágeno y proteoglicanos y la degradación del colágeno mediada por las metaloproteinasas de la matriz (MMPs) son características importantes de este proceso en el cual el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) es un importante mitógeno y está involucrado en la regulación de la producción de colágeno y proteoglicanos, así como media la degradación de los tejidos mediante el control de la síntesis de MMPs y sus reguladores (149).

- **Factor de crecimiento transformante (TGF- β):** constituye un grupo formado por tres isoformas (TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3) con funciones redundantes en la regulación de las células musculares lisas y el endotelio vascular (151). De las tres isoformas, TGF- β 2 es la que mejor relacionada está con el crecimiento ocular en miopía, ya que en modelos animales de miopía se ha demostrado que este factor de crecimiento aumenta sus niveles mientras que el FGF disminuye, actuando de manera antagónica (152). Además, hay una correlación positiva entre la longitud axial del globo ocular y los niveles de TGF- β 2 en el humor acuoso de pacientes humanos con miopía (153). El TGF- β también presenta un potente efecto proangiogénico, al inducir la expresión de VEGF-A por parte del epitelio pigmentario de la retina. Por su parte, su inhibición se ha asociado con el bloqueo de la transición epitelial mesenquimatosa, la senescencia de las células epiteliales y la inhibición de la neovascularización, lo que podrían conducir a nuevos enfoques terapéuticos para tratar las enfermedades vasculares de la retina (151,154).
- **Angiopoyetina (ANG):** es una familia compuesta por dos receptores (TIE-1 y TIE-2) y tres ligandos (ANG-1, ANG-2 y ANG-4). La angiopoyetina 1 funciona como agonista de TIE-2, mientras que ANG-2 como antagonista competitivo de ANG-1 (ANG-4 todavía no ha sido muy bien estudiado). La ANG-2 se libera en las células de punta de los nuevos vasos en el proceso de angiogénesis, mientras que ANG-1 induce las agrupaciones célula-célula en el endotelio así como la deposición de la membrana basal, estabilizando el vaso sanguíneo en formación (131,155).

4.1.2 Papel de la coroides en el crecimiento ocular

Tradicionalmente la función de la coroides ha sido asignada como la de proveer oxígeno y nutrientes a la retina externa, la termorregulación y el mantenimiento de la presión intraocular.

Sin embargo, estudios recientes señalan también un papel de este tejido en el ajuste del enfoque ocular, incluida la emetropización (108). En modelos animales, los cambios en el grosor coroideo sirven para desplazar la retina hacia el plano alterado de foco. En modelos de miopía por privación en pollo, se produce un adelgazamiento coroideo progresivo que tira de la retina axialmente, haciendo que el ojo se alargue y la imagen formada se corresponda con la de un ojo miope. Estos cambios en el grosor coroideo suelen ocurrir muy rápido y son detectables mediante ultrasonografía de alta frecuencia en cuestión de minutos (103,105).

4.1.3 Reorganización escleral en la miopía

La esclera de los mamíferos está compuesta de una sola capa fibrosa de tejido conectivo con una población heterogénea que incluye fibroblastos y miofibroblastos. Los fibroblastos secretan colágeno tipo I, que es el componente principal de las fibras de colágeno. Por su parte, los miofibroblastos son células contráctiles que surgen de la transdiferenciación gradual de fibroblastos y se identifican por la presencia de biomarcadores como vimentina S100a4, periostina y actina de músculo liso α (α -SMA).

Los modelos de miopía tanto por privación como de inducción con lente producen un alargamiento axial del ojo. Estas manipulaciones oculares precisan de cambios en la estructura de la esclera (156–158). La remodelación de los tejidos esclerales es un proceso complejo que involucra tanto la síntesis como la degradación de la matriz extracelular y la participación de proteínas como el colágeno y los proteoglicanos, enzimas como las metaloproteinasas (MMPs) que degradan las proteínas de la matriz extracelular y sus respectivos inhibidores (TIMP) que se unen a las MMPs e inactivan. El debilitamiento de la esclera permite la elongación axial del globo ocular. Durante el desarrollo de la miopía, el recambio de colágeno tipo I aumenta debido a la regulación a la baja de su síntesis junto con una mayor degradación por parte de las metaloproteinasas de la matriz (MMPs). En este proceso participan señales moleculares que involucran al ácido retinoico, la acetilcolina, la dopamina retiniana y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) (112,159,160).

Es importante destacar que la hipoxia escleral desencadenada como consecuencia del alargamiento axial del ojo y del menor aporte de flujo sanguíneo por parte de la coroides inicia una cascada de señalización que conduce a la remodelación de la matriz extracelular de la esclera y, por tanto, del desarrollo de miopía. Todo ello sugiere un papel causal de la hipoxia escleral durante el desarrollo de la miopía (161).

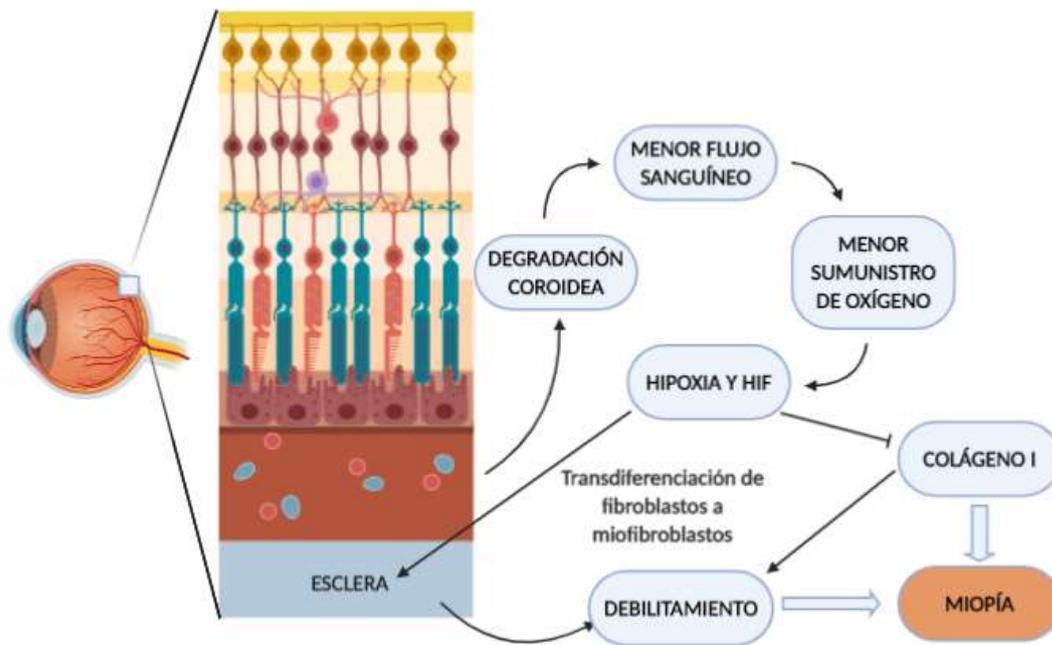


Figura 9: esquema del papel que la hipoxia tiene en la reorganización escleral y coroidea necesarios para la elongación axial del globo ocular. La estabilización del factor inducible por hipoxia (HIF) favorece la transdiferenciación de fibroblastos a miofibroblastos, lo que conduce a la menor producción de colágeno tipo I y al debilitamiento estructural de la esclera. Todo ello favorece la elongación axial del globo ocular y el desarrollo de miopía. Elaboración propia.

4.2 Hipoxia y estrés oxidativo en la miopía alta.

La retina presenta una tasa metabólica excepcionalmente elevada que normalmente se satisface mediante un suministro vascular eficiente (162). Los segmentos externos de los fotorreceptores constituyen la región metabólicamente más activa. Además, la capa de células fotorreceptoras de la retina es avascular y depende de manera crucial de la circulación coroidea subyacente, de manera que la capacidad de regulación del flujo sanguíneo en las regiones exteriores resulta esencial para el buen funcionamiento de la retina (163).

La evolución ha resuelto de manera notable los requisitos contradictorios entre un aporte sanguíneo adecuado para los fotorreceptores, así como una mínima interferencia de los vasos con la trayectoria de luz hacia los conos y bastones por medio de una arquitectura especial. Dos tercios de la retina quedan bajo suministro directo de los capilares retinianos, mientras que el tercio restante obtiene sus nutrientes y oxígeno por difusión desde la coroides para evitar la opacificación de las regiones exteriores de la retina, donde se localizan los fotorreceptores (Figura 12B) (Joanna et al., 2012).

La vasculatura retiniana se compone de una arteria central que penetra en el disco óptico a través de una lámina cribosa, desde donde se ramifica en cuatro arteria intrarretinianas principales (Figura 12A) y estas, a su vez, en arteriolas cada vez más pequeñas que suministran oxígeno y nutrientes a la retina periférica (25,162). Por su parte, el sistema venoso de la retina presenta una organización similar, con una vena central que drena la sangre del globo ocular y sale a través del disco óptico hacia el seno cavernoso (162). A medida que nos desplazamos desde la capa más interior de la retina hacia las capas más exteriores, se va produciendo una caída en la tensión de oxígeno, siendo mínima en la cara externa. De esta manera, las capas más externas, zona en la que se sitúan los fotorreceptores, depende de la irrigación proveniente de la coroides. Este proceso dificulta la oxigenación de los segmentos externos de los fotorreceptores, los cuáles presentan además unas demandas oxigénicas muy elevadas.

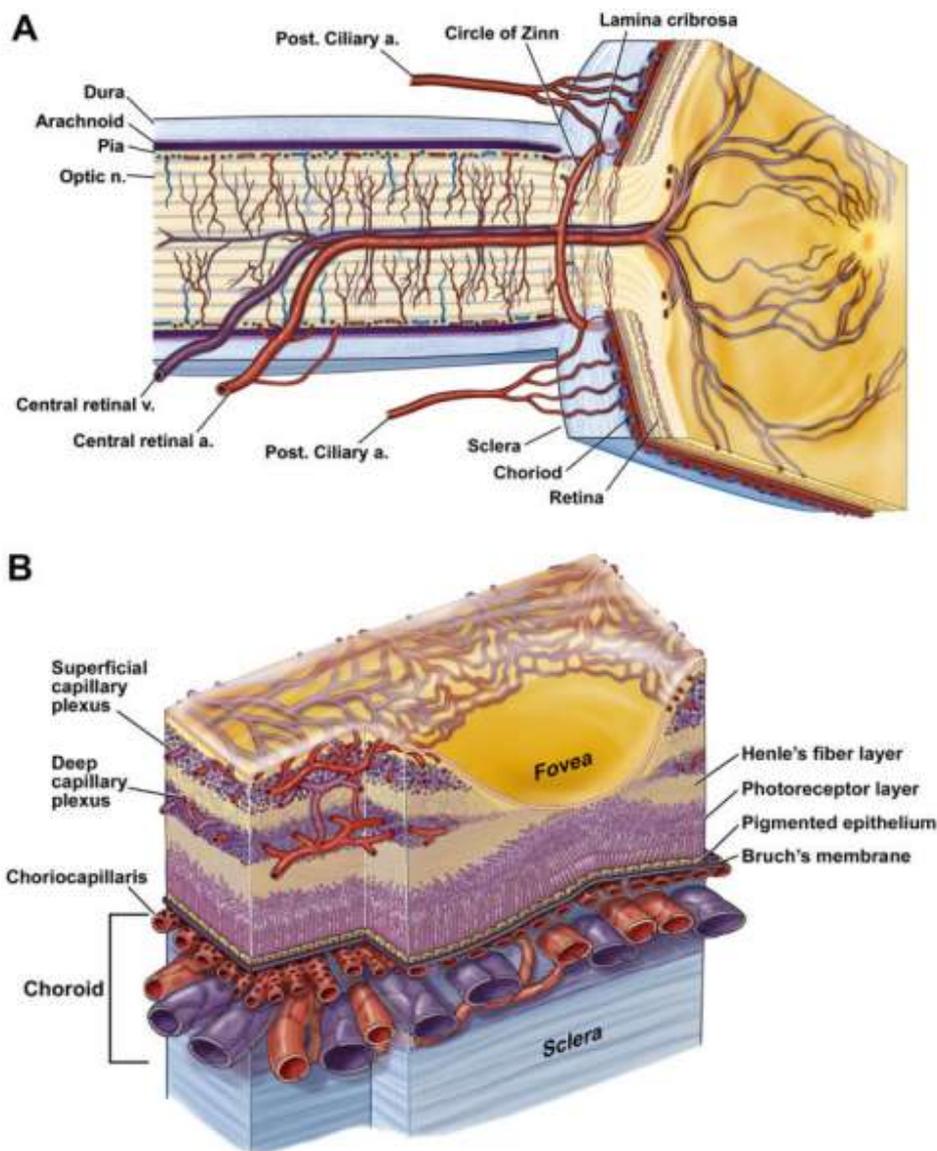


Figura 10: A) arquitectura especial de la vasculatura retiniana con una arteria central que penetra en el disco óptico a través de la lámina cribosa y se ramifica en arteriolas más pequeñas para irrigar los dos tercios interiores de la retina. El sistema venoso de drenaje tiene una organización muy similar; B) detalle de los grandes vasos coroideos que nutren, por difusión, a la capa de fotorreceptores avascular y al epitelio pigmentario de la retina. Adaptado de (162).

Por tanto, el correcto suministro de oxígeno hacia las regiones externas de la retina es esencial para el funcionamiento de los fotorreceptores de manera óptima. En los ojos con miopía alta, como consecuencia de la elongación axial del globo ocular, el suministro de oxígeno y nutrientes desde la coroides hacia la región externa de la retina se ve comprometido, lo que desencadena una serie de respuestas destinadas a revertir tal situación. Las respuestas homeostáticas provocadas incluyen la eritropoyesis, la neovascularización y la glucólisis, todas ellas destinadas a aumentar la entrega de O_2 y de activar las vías metabólicas alternativas que no requieren de él para la generación de energía (18). En estas respuestas están involucrados los productos génicos inducibles por hipoxia, tales como el factor inducible por hipoxia 1 α (HIF 1 α) o la proteína supresora de tumores Von Hippel-Lindau (pVhl) que controla la adaptación mediada por el factor de transcripción inducible por hipoxia (HIF) (164).

La hipoxia se asocia comúnmente a patologías como la isquemia y la inflamación de los tejidos y ha sido ampliamente estudiada en los tumores y terapias destinadas al cáncer (165–167). Sin embargo, los microambientes hipóxicos también ocurren en el desarrollo de numerosos tejidos, impulsando y coordinando el desarrollo de la vasculatura, el sistema nervioso y otros órganos relacionados (168–171) En el ojo, el oxígeno y la condición de hipoxia juegan un papel crucial tanto en el desarrollo vascular normal como en el desarrollo de enfermedades vasculares retinianas, ya que el desarrollo de la vasculatura retiniana tiene lugar como respuesta a la hipoxia fisiológica (170,171).

Los factores inducibles por hipoxia han sido ampliamente estudiados en enfermedades de la retina que cursan neovascularización, como es el caso de la degeneración macular asociada a la edad (DMAE) y, en el caso de nuestra tesis, de la miopía alta. En ambas patologías, las respuestas adaptativas a la baja tensión de oxígeno están orquestadas por sofisticados mecanismos de detección de O_2 (17,172,173). En este proceso, destacan la proteína supresora de tumores Von Hippel-Lindau (pVhl) y el factor inducible por hipoxia (HIF). Niveles elevados de HIF1 α están asociados con una vasculatura retiniana altamente desorganizada, anastomosis y persistencia de estructuras vasculares embrionarias en la edad adulta.

4.2.1 HIF y sus dianas génicas, los Elementos de Respuesta a Hipoxia.

El factor inducible por hipoxia 1 (HIF1) es un factor de transcripción heterodimérico, compuesto por dos subunidades, la HIF-1 α (o sus análogos HIF-2 α y HIF-3 α) y las subunidades HIF-1 β (a esta subunidad también se la conoce como el translocador nuclear de hidrocarburos de arilo o ARNT) que está presente en el interior del núcleo de la célula de manera permanente e independiente de los niveles de O₂ (174). Ambas subunidades pertenecen a la familia de las proteínas bHLH-PAS porque tienen un motivo básico hélice-bucle-hélice. Estos motivos son esenciales para permitir la formación de heterodímeros entre las subunidades HIF-1 α y HIF-1 β en condiciones hipóxicas y comenzar la cascada molecular (175,176). El mecanismo por el cual las células detectan los niveles de oxígeno todavía no está claro, pero evidencias indirectas sugieren que lo más probable es que haya reacciones redox involucradas en este proceso (177).

Bajo condiciones normóxicas, HIF-1 α es ubiquitinado y degradado vía proteasoma, en una vía que involucra a la proteína vVHL, teniendo una vida media muy corta (aproximadamente 5 minutos) (Figura 13). Los residuos de prolina (P402/ P564) ubicados en el motivo LXXLAP de HIF-1 α son buenos sustratos para la acción de un grupo de enzimas llamadas prolil-hidroxilasas (PHD). La hidroxilación de estos dos residuos de prolina es necesaria para la unión de la proteína VHL, que conduce la ubiquitinación de HIF-1 α y a la degradación proteasómica. Estas reacciones de hidroxilación utilizan O₂ y α -cetoglutarato como sustratos, de manera que su actividad enzimática se inhibe en condiciones hipóxicas y la hidroxilación de los residuos de prolina solo ocurre solo cuando hay suficiente cantidad de oxígeno (166,167,178).

Por el contrario, bajo condiciones normóxicas, varias rutas metabólicas mantienen la estabilidad y la actividad transcripcional de HIF-1 α por medio de modificaciones postranscripcionales como la acetilación, ubiquitinación, fosforilación e hidroxilación. En esta situación, las subunidades HIF-1 α y HIF-1 β dimerizan en el interior del núcleo celular, en donde se unen a los elementos de respuesta a hipoxia que contienen la secuencia de consenso 5'-RCGTG-3' (179). Estudios genéticos de secuenciación de ADN han mostrado que el número de genes diana de HIF es superior a 800 y, entre ellos, hay una gran cantidad de genes de susceptibilidad a miopía alta (161,180,181).

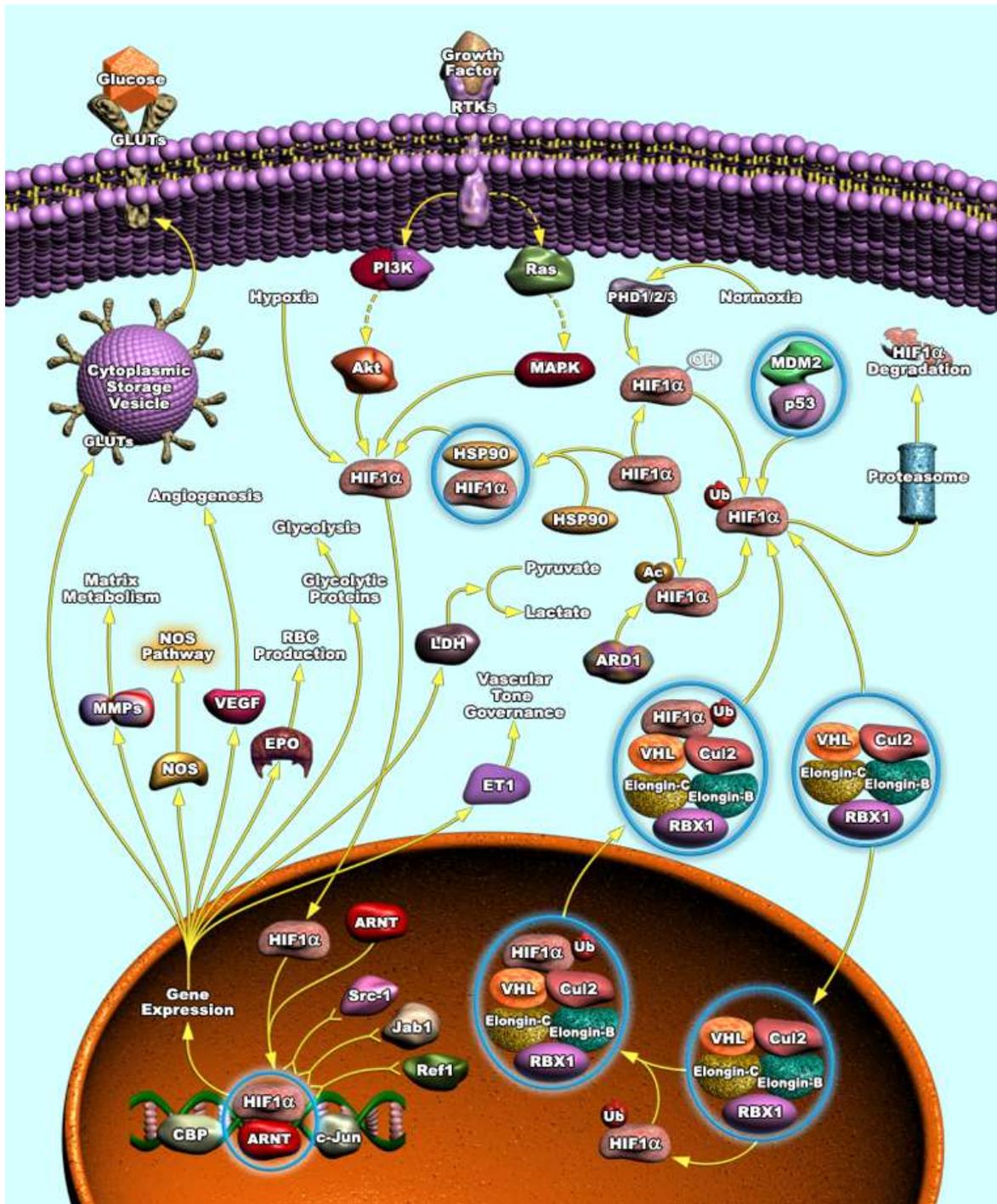


Figura 11: Esquema general del metabolismo de HIF. Bajo condiciones normóxicas, HIF-1 α se hidroxila rápidamente por las enzimas prolin hidroxilasas y es reconocida por la proteína supresora de tumores pVHL. Tras la poliubiquitinación la subunidad HIF-1 α es degradada vía proteasoma 26S. En condiciones hipóxicas, HIF-1 α trasloca al interior nuclear y dimeriza con la subunidad HIF-1 β , tras lo cual se une al DNA y activa la expresión de los elementos de respuesta a hipoxia, que incluyen una serie de respuestas entre las que destacan la síntesis de factores de crecimiento relacionados con la glucólisis, la angiogénesis y enzimas relacionadas con el metabolismo anaeróbico. Adaptado de RayBiotech ELISA kit.

Una vez unido al DNA, el heterodímero HIF- $\alpha\beta$ activa la expresión de los elementos de respuesta a hipoxia (HRE), entre los que están genes relacionados con eritropoyesis, la angiogénesis y la

glucólisis (17,18). Los genes diana prominentes son aquellos que codifican para el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), la transferrina y su receptor, la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS, que favorece la vasodilatación de los capilares y la transferencia de oxígeno a los tejidos), los transportadores de glucosa GLUT-1 y GLUT-3, así como enzimas relacionadas con el metabolismo anaeróbico y la generación de ATP (174).

4.2.2 HIF y el desarrollo de vasculopatías en la Miopía alta

En el caso de múltiples enfermedades vasculares de la retina, entre las que se incluyen la retinopatía diabética, la degeneración macular asociada a la edad, la neovascularización coroidea y la miopía alta tienen una característica común, la isquemia retiniana (17). Ya a mediados del siglo XX se comenzó a estudiar los posibles factores liberados como consecuencia de esta isquemia. Inicialmente la mayor atención se centró en el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF-1 y FGF-2) ya que están presentes en altos niveles en la retina y también poseen actividad proangiogénica (182). Más tarde, los estudios se centraron en el papel que el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) desempeña en el tejido isquémico, estudios que se prologan hasta la actualidad ya que la terapia anti-VEGF es la más utilizada para el tratamiento actual de estos trastornos (132,183,184).

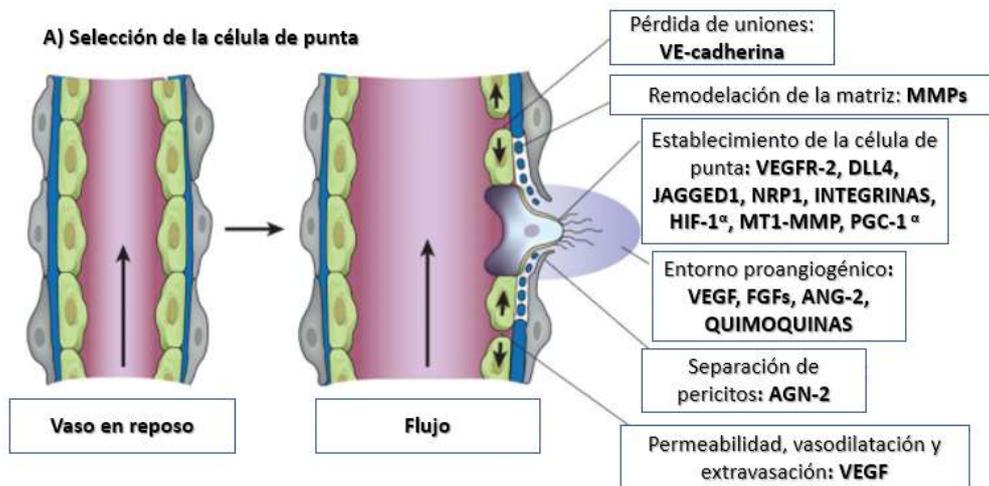
La remodelación y el crecimiento de los plexos vasculares se producen a través de diferentes mecanismos con la división de vasos ya existentes y el brote de nuevos (angiogénesis). Los pericitos y miofibroblastos cubren a continuación el capilar que, finalmente, aumenta su calibre para dividir el capilar en dos vasos paralelos (18) (Figura 14).

La angiogénesis, por medio de la cual se generan nuevos vasos a partir de otros preexistentes, constituye la formación de vasos mejor estudiada y entendida e implica una serie de procesos altamente orquestados. El motor que impulsa este fenómeno es la necesidad de oxígeno y nutrientes del tejido circundante, lo que incita la producción de factores de crecimiento de fibroblastos (FGF), estimula la producción de VEGF, así como otros productos angiogénicos (131).

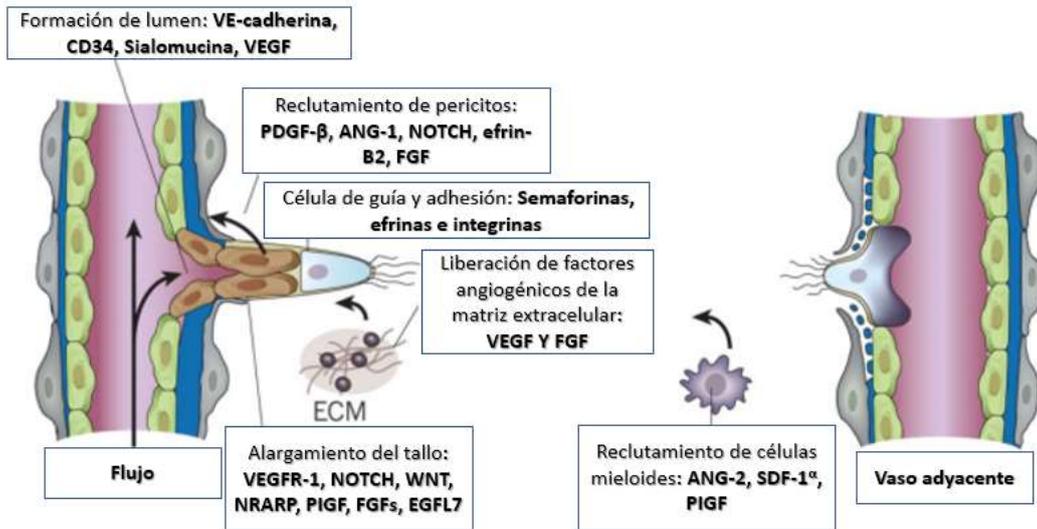
Cuando un vaso detecta una señal angiogénica como el VEGF, FGF o las quimiocinas liberadas por las células sometidas a condiciones de hipoxia, primero incitan a los pericitos de la pared del vaso a desprenderse como respuesta a la angiopoyetina 2 y se liberan de la membrana basal por degradación proteolítica mediada por las metaloproteinasas de la matriz (MMPs). Como consecuencia las células endoteliales aflojan sus uniones y el vaso naciente se dilata. En respuesta a la señalización de las integrinas, las células endoteliales migran hacia la superficie

de la matriz extracelular y las proteasas liberan moléculas angiogénicas almacenadas en la matriz como el VEGF y el FGF. Para dirigir la formación del vaso, una célula endotelial conocida como célula de punta es seleccionada para dirigir el crecimiento del nuevo vaso en respuesta a VEGF, neuropilinas (NRP) y los ligandos NOTCH, DLL4 y JAGGED1. Las células adyacentes a la célula de punta se dividen y aumentan el tamaño del tallo, proceso estimulado por NOTCH, WNT, el factor de crecimiento placentario (PIGF) y FGF. El programa general, dirigido por HIF-1 α , hace que las células endoteliales respondan a las señales proangiogénicas. Finalmente, las células del puente mieloide ayudan a la fusión con la otra rama del vaso, permitiendo la formación del flujo sanguíneo.

Una vez formado el vaso y para que este sea funcional debe sufrir un proceso de maduración en el que las células endoteliales responden a señales como el factor de crecimiento derivado de plaquetas B (PDGF-B), la angiopoyetina 1 (ANG-1), el factor de crecimiento transformante (TGF- β) y NOTCH, que hace que las células se cubran de pericitos. Además, inhibidores tisulares de las metaloproteinasas (TIMP) y del activador de plasminógeno tisular (PAI) causan la deposición de una membrana basal y las uniones entre las células endoteliales se restablecen para garantizar una distribución óptima del flujo sanguíneo (Figura 14C).



B) Crecimiento del vaso bajo la guía de la célula de punta



C) Resolución y formación de un vaso funcional

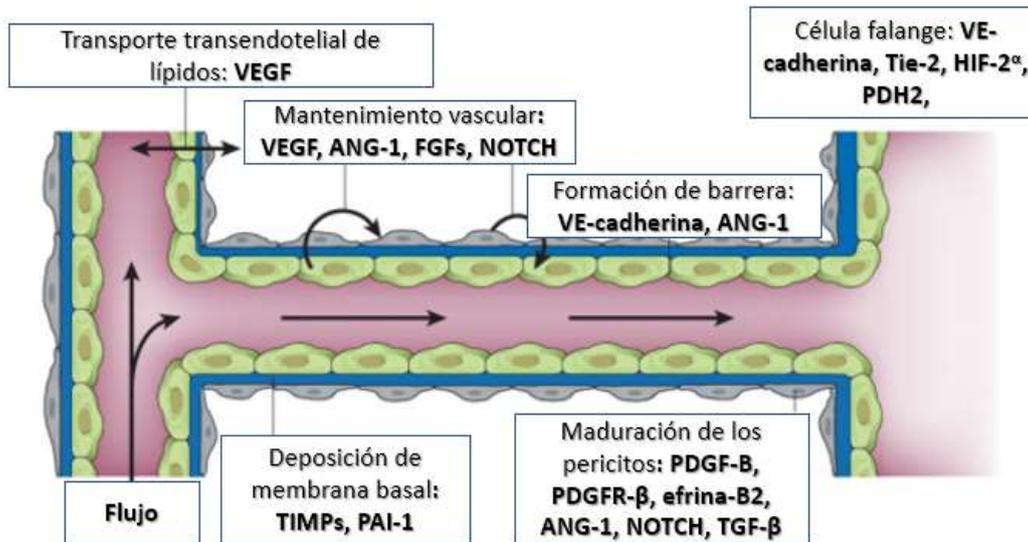


Figura 12: Esquema general de la vasculogénesis inducida como consecuencia de la hipoxia. Adaptado de (131).

Una vez comprendida la complejidad del proceso angiogénico desencadenado como respuesta a la hipoxia, cabe destacar que un solo factor de crecimiento, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), regula la angiogénesis de manera predominante. Por esta razón, la terapia anti-VEGF es la habitual en numerosas patologías oculares que cursan con vasculopatía retiniana, tales como la degeneración macular asociada a la edad o los desprendimientos de retina. Estudios recientes que involucran a animales han demostrado que inyecciones intraoculares de anti-VEGF también inhiben la progresión de la miopía por privación (134,135,185). Sin

embargo, en muchos pacientes estos fármacos alcanzan resultados subóptimos debido a que hay muchos factores que participan en el proceso (158,186).

Por último, la compleja cascada inflamatoria y proangiogénica desencadenada en los tejidos posteriores evoca respuestas adicionales del sistema inmunitario (173). La activación descontrolada de los procesos inmunes está asociada con la aparición y desarrollo de la maculopatía miope característica de los ojos con alta miopía. En estos procesos, nuestro grupo de investigación ha indagado sobre el papel que el sistema del complemento tiene a la hora de predisponer al paciente a padecer tales patologías en el contexto de la miopía alta, especialmente la atrofia coriorretiniana y la neovascularización.

4.3 El sistema del complemento en la miopía alta.

El sistema del complemento se descubrió por primera vez en la década de 1980 al conocerse un conjunto de proteínas que “ayudaban” o “complementaban” la destrucción de bacterias mediante anticuerpos termoestables presentes en el suero (187). Está constituido por más de 30 proteínas presentes como proteínas solubles o asociadas a membrana. Inicialmente se pensaba que el complemento desempeñaba un papel importante en la inmunidad innata, donde orquesta una robusta respuesta contra los patógenos externos. Sin embargo, estudios recientes evidencian que el complemento también participa en la inmunidad adaptativa, que involucra a las células T y B en la eliminación de patógenos y en el mantenimiento de la memoria inmunológica para prevenir futuras reinvasiones. Además, el complemento también participa en la regeneración de tejidos, en el crecimiento tumoral y en los estados patológicos humanos tales como el síndrome urémico hemolítico atípico, la degeneración macular asociada a la edad, la miopía alta, etc. (188–191).

Su activación conduce a una cascada secuencial de reacciones enzimáticas conocidas como vías del complemento: la vía clásica, la vía de las lectinas y la vía alternativa (Figura 15). Todas ellas convergen en la formación de las potentes anafilatoxinas C3a y C5a, que provocan una gran cantidad de respuestas fisiológicas que van desde la quimioatracción hasta la apoptosis (192).

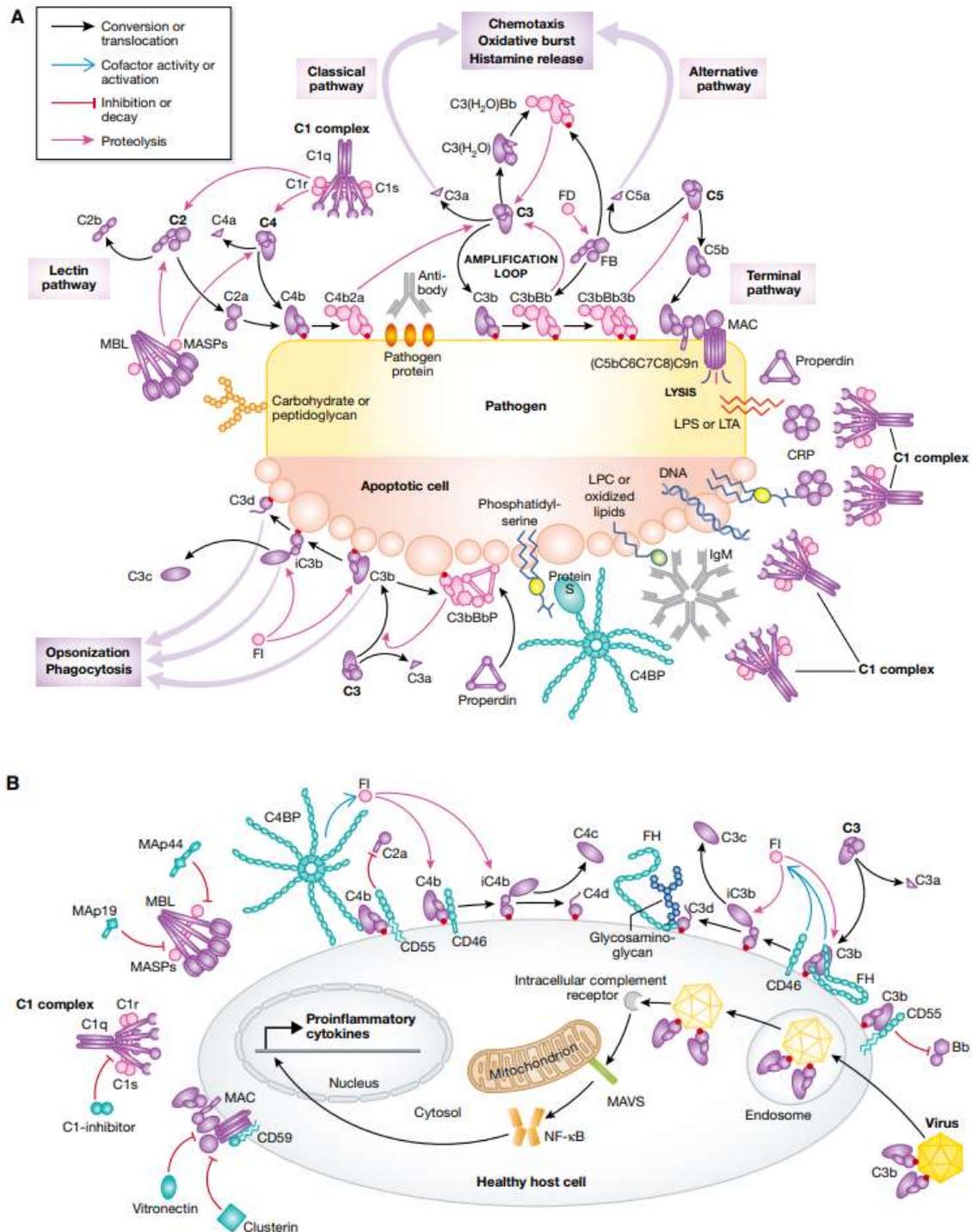


Figura 13: vista molecular de la cascada de activación, amplificación y regulación del complemento. A) en la vía clásica las moléculas de reconocimiento de patrones perciben la presencia de patógenos. Este reconocimiento induce la autoactivación de C1r, el cual activa a C1s. Todo ello es seguido por la escisión de C4 y C2 y la posterior formación de la convertasa C3. En la vía de las lectinas, los patrones de glucanos se detectan a través de MBL, CL-LK o ficolinas, lo que conduce a la activación de MASP y a la formación de la misma convertasa C3. Las convertasas C3 escinden C3 en C3b, que también se une a la superficie del activador. El C3b recluta al FB, lo que conduce a la activación de FB y a la formación de C3bBb, que escinde más C3 y amplifica la activación del complemento. Ambas convertasas de C3 unidas a la superficie pueden unirse a una molécula de C3b por lo que se forman las convertasas C5, que escinden C5 en C5a y C5b, iniciando así la vía terminal y la formación del complejo de ataque de membrana (MAC). B) la activación y amplificación del complemento se atenúa en la superficie del huésped. Las células sanas expresan

reguladores como el FH que actúan como cofactores para la degradación mediada por FI o impiden el ensamblaje de MAC. Adaptado de (193).

- **La vía clásica:** se inicia tras la unión de las inmunoglobulinas G (IgG) o M (IgM) a patógenos y otros antígenos extraños, dando lugar a la formación de los complejos inmunes (192). El complejo C1, un complejo multimérico de 400Kda está compuesto por 3 proteínas, una copia de C1q y dos copias de C1r y C1s, todo ello estabilizado por uniones Ca^{2+} . Este complejo se une al fragmento Fc de la IgG o IgM que hayan interactuado previamente con un antígeno polivalente. La unión de C1q al fragmento Fc de las inmunoglobulinas provoca un cambio conformacional que determina la activación de C1r, el cual escinde y activa a C1s. Dicha activación completa la primera etapa en la activación de la vía clásica(194).

A continuación, C1s escinde a C4. C4 es un componente formado por tres cadenas polipeptídicas (α , β y γ) unidas por puentes disulfuro. El C1s activado escinde múltiples moléculas de C4 y origina dos fragmentos, uno de bajo peso molecular, denominado C4a (9.000Da) y otro denominado C4b, de alto peso molecular que contiene el tripéptido $\alpha\beta\gamma$. Este fragmento C4b expresa un grupo tioéster que le permite unirse a la superficie de la célula diana a través de un enlace covalente de tipo éster o amida. El 2-10% del C4b generado se une a la superficie de la célula diana, mientras que el resto es inactivado por hidrólisis, inactivación que resulta crucial para evitar que el C4b se una a células propias. Cuando el C4b se une a la superficie de la célula diana deja un sitio aceptor para el componente C2, lo que permite la formación del complejo C4bC2. El componente C2, es escindido a su vez por el C1s adyacente y da lugar a la formación de un fragmento de bajo peso molecular, C2a y a otro de mayor peso molecular, el C2b. Finalmente, los fragmentos C4b y C2a forman la convertasa C3, C4bC2a. Esta convertasa C3 puede activar centenares de moléculas C3, propiedad que le permite constituirse como el principal motivo de amplificación de la cascada de activación, liberando C3a y C3b. La mayoría de los fragmentos C3b generados participan en el proceso de opsonización celular, mientras que la unión de algunos de ellos a la convertasa C3 origina un complejo trimolecular, el complejo C4b2a3b o convertasa C5 de la vía clásica. Esta convertasa une C5 y lo vuelve vulnerable a la acción proteolítica de C2b, lo cual genera dos fragmentos: el de menor peso molecular, C5a se libera a la fase soluble mediando una notable actividad quimiotáctica y anafiláctica. Por su parte, el de mayor peso molecular, C5b, se une a la superficie de la célula diana y contribuye a la formación

del complejo de ataque de membrana tras la unión de C6, C7, C8 y múltiples moléculas de C9 a C5b y contribuye a la lisis celular (195,196).

- **Vía de las lectinas:** es activada, fundamentalmente por los receptores de reconocimiento de los patrones solubles MBL y las ficolinas H y L. En esta vía, la MBL se une a restos de azúcar repetitivos como la manosa y, posteriormente, MBL y MASP2 forman un complejo tipo C1. Una vez activado, escinde C4 y C2 y converge con la vía clásica en la formación de la convertasa C3 (C4bC2a).
- **La vía alternativa:** esta vía funciona como un sistema de vigilancia inmunitaria a través del cual los microorganismos son opsonizados en ausencia de anticuerpos específicos. Involucra a cuatro proteínas: C3, el factor B, el factor D y la Properdina (P). La contribución fundamental de la vía alterna es la de potenciar la activación de la vía clásica, es decir, funciona como un mecanismo amplificador. De hecho hasta el 80% de la activación total del complemento se ha atribuido a este bucle de amplificación (197) (Figura 15).

Tal y como mencionamos anteriormente, la activación de la vía clásica conduce a la generación de numerosas moléculas de C3b, que se unen de forma covalente a la superficie de la célula diana. En presencia de C3b, el factor B se une a C3b y es escindido por el factor D, que expresa actividad serinoproteasa. La escisión de B origina dos fragmentos: uno de bajo peso molecular, llamado Ba, que es liberado a la fase soluble; y un fragmento mayor, Bb, que permanece unido a C3b sobre la superficie de la célula diana y forma el complejo biomolecular C3bBb o convertasa C3 de la vía alternativa.

La interacción del complejo C3bBb con Properdina conduce a la formación de C3bBBP y potencia la actividad de la convertasa C3 al incrementar su estabilidad. La convertasa C3 de la vía alterna escinde numerosas moléculas de C3 y genera grandes cantidades adicionales de C3b, que contribuyen a la opsonización de la célula diana. Algunas de las moléculas de C3b generadas se unirán a la convertasa C3 de la vía alterna para formar la convertasa C5, las cuáles escindirán C5 y generarán C5a y C5b, componente que comienza el ensamblado del complejo de ataque de membrana.

Para el correcto funcionamiento del complemento, es preciso un control fino de su actividad ya que su desregulación podría provocar inflamación y daño celular. Esto es particularmente

importante en la vía alternativa, ya que está constantemente activa a través de la hidrólisis constitutiva de baja velocidad del tioéster interno de C3 (191,198).

4.3.1 Regulación de la vía alternativa del complemento: factores H, D, B e I.

4.3.1.1 El factor H del complemento

El factor H del complemento es una glucoproteína de 155Kda, codificada por un solo gen (HF1) ubicado en el cromosoma 1q32. El HF1 está estrechamente relacionado con los genes FHR1, FHR2, FHR3, FHR4 y FHR5 que codifican para cinco proteínas plasmáticas relacionadas con el factor H. Su estructura génica comprende 23 exones y se extiende por más de 94 Kb de ADN genómico. Similar en su estructura molecular a otros reguladores del complemento, la forma secretada del FH se compone de 20 unidades repetitivas de 60 aminoácidos, denominadas “repeticiones de consenso cortas” o “módulos de proteínas de control del complemento”, dispuestos de manera continua como una cadena de 20 cuentas (199).

El factor H es producido constitutivamente por el hígado y se mantiene en el plasma a concentraciones de 110-615 µg/ml. La síntesis extrahepática también se produce en una amplia variedad de tipos celulares, como linfocitos de la sangre periférica, mioblastos, células endoteliales, células gliales y neuronas (199). Así, aunque la mayoría de los componentes del complemento circulante son producidos por el hígado, la retina muestra una síntesis extrahepática del complemento, probablemente para superar el acceso restringido de proteínas plasmáticas a la retina a través de la barrera hematorretiniana (200).

Su función principal es la regulación de la vía alternativa, inhibiendo la activación de C3 tanto en fase fluida como sobre las superficies celulares (199). El factor H se une a C3b y acelera la descomposición de la convertasa C3 de la vía alternativa (C3bBb) y actúa como cofactor para la inactivación proteolítica de C3b mediada por el factor I. La escisión proteolítica de C3b por el factor I ocurre solo cuando C3b está en complejo con su cofactor, CFH (201,202). Por tanto, el factor H del complemento es un regulador clave del sistema del complemento cuya función es mantener un nivel óptimo de C3 en circulación (199).

Las alteraciones genéticas de este factor, incluida su deficiencia absoluta, se han asociado con numerosas patologías (203). Recientemente, polimorfismos de CFH (Y402H) se han asociado con un mayor riesgo de padecer degeneración macular asociada a la edad (DMAE), así como valores

anormales del mismo han sido hallados en el humor acuoso de pacientes con miopía alta (199,204,205).

4.3.1.2 El factor D del complemento.

El factor D del complemento, también conocido como adipsina o CFD, es un miembro de la familia de las serina proteasas que regula un paso clave en la activación de la vía alternativa del complemento (Figura 15). Se expresa en varios tejidos y tipos celulares, pero su síntesis principal tiene lugar en el tejido adiposo y los macrófagos, manteniéndose en unas concentraciones plasmáticas muy bajas, 1-2 $\mu\text{g/ml}$ (las más bajas de todas las proteínas del complemento) (206). Al igual que sucede con otras serina proteasas, es secretado en forma de zimógeno inactivo, precisando de un cambio conformacional para su activación. Su activación posterior ocurre cuando se une a C3Bb, al factor B, a Mg^{2+} y a C3b. Tras la unión al complejo, el factor D se vuelve transitoriamente activo y es capaz de escindir al factor B, lo cual genera fragmentos de Ba y Bb, paso limitante en la formación de la convertasa C3, que amplifica la señal inicial y es crucial para la activación de la vía alternativa (207). Además, es un sustrato altamente específico debido a su arquitectura y carece de inhibidor endógeno conocido (208).

La activación desregulada del sistema del complemento se ha asociado en numerosos estudios con diversas patologías como la degeneración macular asociada a la edad, la miopía alta o el síndrome urémico hemolítico atípico. Por esta razón, la inhibición del factor D podría ser un mecanismo atractivo de bloqueo del sistema del complemento con alta especificidad y eficiencia (208). Aunque su patogenia en la DAME sigue sin estar clara, la evidencia del factor D incluye lo siguiente: en un modelo con deficiencia genética del factor D, los ratones estaban desprotegidos contra la degeneración de los fotorreceptores mediada por estrés oxidativo y un aumento de la actividad sistémica del complemento, incluido el factor D, fue detectado en el suero de pacientes con DMAE en comparación con los controles (209).

Las alteraciones de los factores H y D del complemento se han relacionado con la DMAE atrófica y su forma final, la atrofia geográfica. Esta variante de la DMAE cursa con atrofia progresiva de la coroides seguida de atrofia retiniana y pérdida de visión. Proceso similar, en cierto modo, a la atrofia coriorretiniana progresiva típica de la miopía alta (204,205,210).

4.3.1.3 El factor B del complemento

Es una glucoproteína de 90KDa compuesta por tres módulos CCP, un segmento de conexión corto, un dominio de factor von Willebrand tipo A y un dominio SP. Circula como una proenzima y su sitio de activación está regulado por FD. FB puede formar un complejo con C3b o moléculas similares a C3b para generar la proconvertasa C3bB. En la conformación abierta de C3bB, FB es accesible a la escisión de FD, liberando el fragmento Ba. El fragmento restante, Bb mantiene su actividad enzimática como parte del complejo C3bBb. Una vez que Bb se disocia del complejo convertasa, no puede volver a asociarse con C3b. Por todo ello, FB es esencial para la activación de AP (193,211).

4.3.1.4 El factor I del complemento

El factor I es una glucoproteína de 88Kda sintetizada principalmente por los hepatocitos que tiene un papel destacado en el control del sistema del complemento. El FI circula como una enzima activa en la sangre y carece de inhibidor, al igual que el FD. Además, el FI tiene una actividad catalítica extremadamente baja hacia sustratos sintéticos y hacia C3b y C4b, por lo que para escindirlos de manera eficiente necesita de cofactores, entre los que destacan C4b y FH. A medida que se forma el complejo ternario C3b-FH-FI, FI obtiene la actividad proteolítica completa.

Actuando de manera coordinada con sus cofactores, el FI puede regular a la baja a todas las rutas de activación de la cascada del complemento y contribuye a la defensa de los tejidos del huésped contra los daños infligidos por el propio complemento mediante la descomposición de C3b en fase fluida a iC3b. Los productos de degradación de C3b inician una respuesta inmune celular a través de su interacción con varios receptores situados en las células inmunes.

De acuerdo con su importante papel en la regulación del complemento, la ausencia de FI causa condiciones peligrosas debido al aumento de la presencia de C3b y a la activación descontrolada de AP. Las personas con deficiencia de FI son propensas a sufrir infecciones bacterianas recurrentes, enfermedades renales graves y, sobre todo, degeneración macular asociada a la edad (211,212).

Todo este contexto molecular particular (mayor expresión de factores inducidos por hipoxia, niveles incrementados de factores de crecimiento ocular y sobreactivación del complemento) hacen que la miopía alta sea una patología compleja y multifactorial que predispone al ojo a padecer numerosas complicaciones clínicas derivadas.

4.4 Complicaciones clínicas derivadas de la miopía alta: el estafiloma posterior y la maculopatía miope

La miopía alta o patológica se caracteriza por la presencia de cambios degenerativos en el segmento posterior asociados al alargamiento progresivo del globo ocular y que involucran a la esclerótica, el disco óptico, la coroides, la membrana de Bruch, el epitelio pigmentario de la retina y la retina (95). En España, las complicaciones clínicas asociadas a la miopía alta constituyen la cuarta causa de ceguera legal, solo superada por la degeneración macular asociada a la edad, el glaucoma y la retinopatía diabética (213).

4.4.1 El estafiloma posterior

El curso natural de la elongación axial y el desarrollo de la miopía patológica todavía no se conoce exactamente, pero los avances en la tomografía de coherencia óptica (OCT) han revelado el desarrollo de una estructura característica de los ojos alto miopes llamada estafiloma posterior (96). Un estafiloma se define como la presencia de una “protuberancia de la pared del ojo que tiene un radio de curvatura menor que la curvatura circundante de la pared” (95). Su formación parece estar relacionada con una estructura defectuosa de la esclera, ya que el tamaño del estafiloma se correlaciona con el grado de adelgazamiento escleral (96,214). Ohno-Matsui y sus colaboradores (215) demostraron recientemente que dicho estafiloma no debe considerarse como una característica distintiva de la miopía patológica, contradiciendo estudios previos (101,216), pero sí la principal causa del establecimiento de la maculopatía miope (213). Sin embargo, aunque el estafiloma posterior es una de las principales causas de maculopatía miope, no puede considerarse la única, dado que el alargamiento axial sin estafiloma posterior también puede conducir a maculopatía miope, aunque esto es mucho menos común (95).

La tomografía de coherencia óptica (OCT) es una técnica de imagen no invasiva que ha permitido ampliar enormemente nuestros conocimientos acerca de los cambios del polo posterior del ojo. El estudio de la mácula de los pacientes con miopía alta revela la existencia de una concavidad creciente a medida que aumenta la longitud axial del globo ocular. Inicialmente, dicha concavidad es pequeña, pero con el tiempo aumenta su tamaño y acaba afectando al disco óptico (217,218).

El 1977, Curtin elaboró una clasificación de los estafilomas en 10 tipos, 5 primarios y 5 formas compuestas, basándose en su apariencia fundoscópica. El estafiloma tipo I, denominado estafiloma de polo posterior es el tipo más común. Por su parte, los tipos de estafilomas menos comunes son los peripapilares e inferiores, que aparecen con menor frecuencia. Sin embargo,

esta clasificación tiene una cierta base subjetiva, ya que está establecida de acuerdo con las apariencias oftalmológicas y los dibujos de fondo.

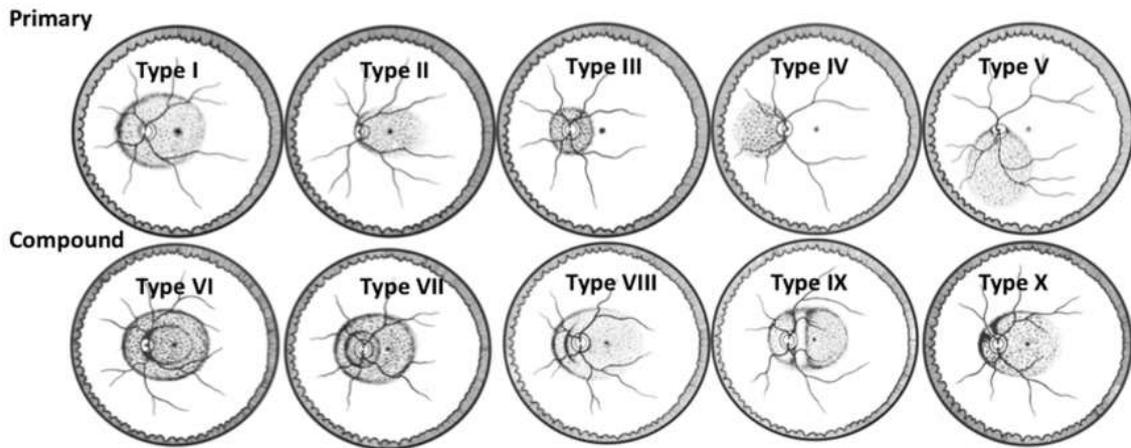


Figura 14: esquema de los diez tipos de estafiloma diferentes según la clasificación de Curtin 1977.

El estafiloma posterior se profundiza y cambia de forma con la edad. Los estafilomas I y II pueden evolucionar a un estafiloma de tipo IX debido al desarrollo de una protuberancia en forma de cresta en la zona del disco óptico como resultado del estiramiento de la esclera peripapilar (219).

Las tecnologías de imagen desarrolladas recientemente han mejorado la cuantificación y clasificación de los estafilomas. Ikuno y colaboradores han utilizado la tomografía de coherencia óptica de dominio espectral (SD-OCT) para medir los estafilomas posteriores en ojos altamente miopes, descubriendo que el tamaño del estafiloma se correlaciona estrechamente con los errores de refracción, el grosor coroideo y la longitud axial (220). Además, numerosos autores han evaluado el papel de los estafilomas en el desarrollo de la atrofia coriorretiniana, mostrando una estrecha asociación entre la profundidad del estafiloma y defectos en el epitelio pigmentario de la retina, grietas de laca y atrofia coriorretiniana (221). En el 2014, Ohno-Matsui evaluó el papel del estafiloma en el desarrollo de la maculopatía miope, evidenciando que la atrofia coriorretiniana y la neovascularización miope es más común en ojos estafilomatosos que en ojos sin estafiloma (222).

4.4.2 La maculopatía miope.

Entre las muchas características clínicas de la miopía alta, probablemente lo más característico son aquellas condiciones que afectan a la parte posterior del ojo debido al alargamiento axial

del ojo. Estos daños pueden amenazar la visión y, a menudo, conducen a cambios irreversibles en los fotorreceptores maculares y a pérdida de visión central. Los siguientes hallazgos son los considerados como más comunes en la maculopatía miope:

- Adelgazamiento retiniano, coroideo y escleral (223).
- Atrofia coriorretiniana, que puede aparecer como mosaicismo, atrofia difusa, atrofia irregular y estrías lacadas (213).
- Neovascularización coroidea (224–226).
- Maculopatía asociada a cambios de tracción en los ojos miopes que tiene como consecuencia la aparición de foveosquisis y agujero macular (227).
- Mácula en forma de cúpula, generalmente asociada a desprendimiento de retina (217,228).
- Agujeros en la membrana de Bruch. Estos agujeros pueden ser estar asociados a estrías lacadas, estafiloma o a atrofia difusa (229).

En 1971 Curtin y Karlin fueron los primeros en proponer una definición para la maculopatía miope, que incluía la presencia de atrofia coriorretiniana, manchas centrales de pigmento, estrías lacadas, estafiloma posterior y cambios en el disco óptico (230). Más tarde, en 1984 Ávila y sus colaboradores propusieron un nuevo sistema de clasificación para describir el curso de la atrofia macular miope basada en fotografías del fondo del ojo. El sistema de clasificación propuesto consta de seis grados, de M_0 - M_5 , en los que M_0 se corresponde con apariencia normal; M_1 , mosaicismo; M_2 , estafiloma posterior; M_3 , estrías lacadas; M_4 , atrofia coroidea profunda; M_5 , neovascularización (216). Esta clasificación es la empleada por nuestro grupo de investigación para la clasificación macular de nuestros pacientes.

Por maculopatía miope podemos entender al conjunto de alteraciones maculares inducidas por miopía alta, en las cuáles un exceso de longitud axial y/o la presencia de un estafiloma posterior son los principales desencadenantes. Estas alteraciones maculares incluyen no solo cambios atróficos, sino también alteraciones neovasculares y cambios en la mácula inducidos por las modificaciones específicas del polo posterior (213). Por estas razones, establecemos una clasificación de la maculopatía miope en tres categorías:

- Maculopatía miope atrófica
- Maculopatía miope neovascular
- Maculopatía miope por tracción

4.4.2.1 Maculopatía miope atrófica.

La maculopatía miope atrófica podría considerarse como equivalente a la degeneración macular asociada a la edad atrófica, ya sea como consecuencia primaria de corioidopatía miope o como resultado de la neovascularización. Se asocia con una disminución progresiva de la agudez visual y se debe a la degeneración coriorretiniana del polo posterior. Consiste en parches locales de tejido junto al epitelio pigmentario con acumulación de pigmento en el borde de la lesión, parches que se vuelven confluentes, formando grandes áreas geográficas de atrofia que se fusionan (213).

Aunque la patogenia de la maculopatía atrófica no se entiende correctamente, se cree que está asociada al establecimiento de un estafiloma, que ocasiona cambios en la coroides y la retina que dañan severamente a los tejidos vecinos. No está claro si estos cambios son parte de un proceso genéticamente determinado o si estas modificaciones son causadas por cambios biomecánicos inducidos por la expansión escleral (231).

El alargamiento anteroposterior induce un estiramiento de las capas oculares y un adelgazamiento progresivo de la coroides, así como cambios en la hemodinámica coroidea, con pérdida del estroma coroideo y la obliteración de los vasos. El adelgazamiento coroideo generalmente se asocia con la edad y con el grado de miopía. La oclusión posterior de los vasos coroideos conduce al desarrollo de tejido fibrótico y pérdida de fotorreceptores debido a una oxigenación reducida y, finalmente, a una pérdida de visión central (232).

Hayashi y colaboradores describen en 2010 (233) la progresión de la maculopatía miope de la siguiente forma: el fondo en mosaico evoluciona hacia zonas de atrofia difusa con estrías lacadas, seguida de una progresión hacia áreas con atrofia irregular. Finalmente, las zonas de atrofia difusa se agrandan y unen dando lugar a parches de atrofia coriorretiniana profunda.

- **La atrofia coriorretiniana difusa:** se puede identificar por el fondo blanco-amarillento del polo posterior. La extensión de la atrofia puede variar desde un área restringida alrededor del disco óptico y una parte de la mácula hasta todo el polo posterior. El área de atrofia que generalmente primero aparece es alrededor del disco óptico y, a menudo, progresa y aumenta con la edad. Tanto la edad como la longitud axial se han descrito como factores de riesgo (234). Su estudio con OCT muestra un adelgazamiento marcado de la coroides en el área atrófica (235).
- **Las estrías lacadas:** son rupturas de la membrana de Bruch que, generalmente, se asocian con un estafiloma posterior. Estas lesiones aparecen como múltiples líneas

irregulares, de color blanco-amarillento, ocasionalmente ramificadas. Son más comunes en varones y su incidencia disminuye con la edad. Las estrías lacadas y la atrofia coriorretiniana son los factores predisponentes más comunes para el desarrollo de neovascularización. Su incidencia en pacientes con alta miopía es de 4.3-15-7% y pueden desarrollarse en una edad temprana, teniendo una edad media de aparición de 32 años. Sin embargo, al igual que sucede con las demás atrofas coriorretinianas, su frecuencia aumenta con la edad. Así mismo, se consideran un factor de riesgo para la formación de atrofia coriorretiniana irregular y neovascularización coroidea.

- **Atrofia coriorretiniana irregular:** lesiones bien definidas, de color blanco grisáceo, situadas alrededor del disco óptico. Se caracterizan por una pérdida completa de la coriocapilar y pueden progresar hacia una ausencia de retina externa y del epitelio pigmentario. Debido a esto, se pueden observar con claridad los vasos coroideos grandes desplazados dentro del área atrófica. En la zona atrófica se puede observar una acumulación de pigmento, especialmente a lo largo del margen de la zona atrófica y de los vasos coroideos. Su observación por OCT se caracteriza por la ausencia completa de coroides y epitelio pigmentario de la retina en la zona atrófica (215). La atrofia irregular puede desarrollarse a partir de tres fuentes: a partir de estrías lacadas, dentro del área de atrofia coriorretiniana difusa y a lo largo del borde del estafiloma posterior (233).

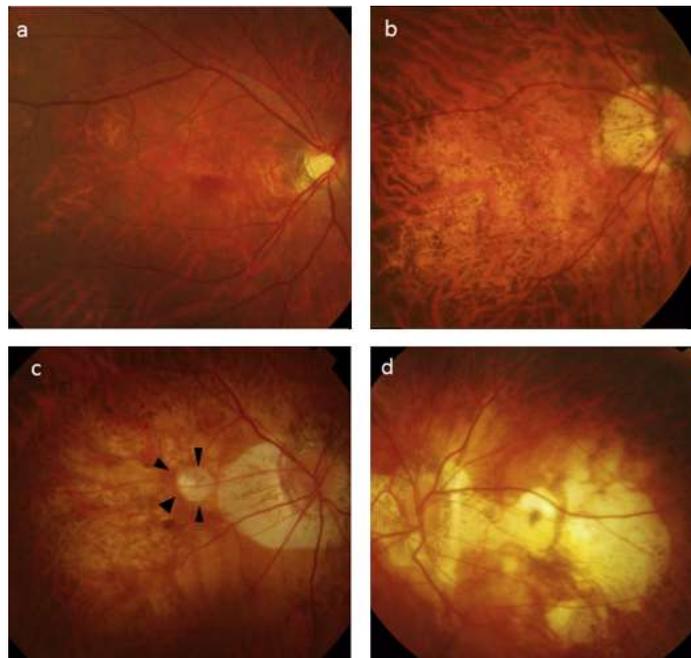


Figura 15: a) mosaicismo en el que el contorno de los vasos coroideos es fácilmente visible en el polo posterior; b) atrofia coriorretiniana difusa, con un color amarillento en el polo posterior; c) atrofia coriorretiniana irregular (flechas negras), con lesiones bien definidas de color grisáceo; d) atrofia macular. Adaptado de (215).

4.4.2.2 Maculopatía neovascular.

Constituye una de las complicaciones más graves de la miopía patológica, que a menudo conduce a una pérdida de visión central con una prevalencia en pacientes con miopía alta que varía de un 5-11% (236).

En general, el curso natural de la neovascularización prosigue con la manifestación de los síntomas en el otro ojo. Se produce una disminución de la agudeza visual progresiva y puede terminar desarrollando un agujero macular o retinosquisis (237). En el año 1998, Tokoro clasificó la neovascularización miope en 3 etapas: activa, cicatrizante y atrófica. En la etapa activa, se forma una membrana fibrovascular alrededor de la lesión y puede haber sangrado evidente; la etapa de cicatriz se caracteriza por la absorción de la sangre y puede convertirse en un punto hiperpigmentado llamado “Mancha de Fuchs”; la etapa atrófica, caracterizada por el establecimiento de un área atrófica (237).

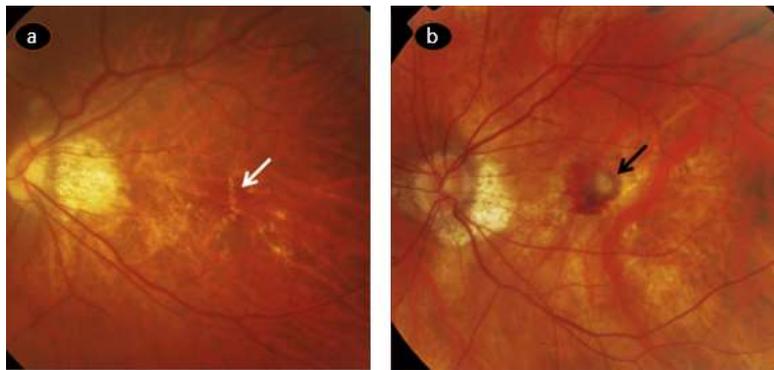


Figura 16: a) estrías lacadas (flecha blanca) con patrón lineal y b) mancha de Fuchs (flecha negra), que representa la fase de cicatrización de la neovascularización coroidea miope. Adaptada de (215).

Aunque su patogenia todavía no está muy clara, se han identificado una serie de posibles factores de riesgo y mecanismos patológicos como la atrofia coriorretiniana irregular, defectos del epitelio pigmentario de la retina, estrías lacadas y adelgazamiento coroideo del polo posterior (238).

El papel de los factores de riesgo sistémicos en el desarrollo de la neovascularización no está muy bien definido. Varios estudios han abordado la relación entre la fisiopatología miope y la inflamación, demostrando la asociación de la enfermedad a ciertos marcadores inflamatorios como factores del complemento y la proteína C reactiva. Así, los pacientes con neovascularización mostraron niveles aumentados de C3, lo que sugiere ser un factor de riesgo. También se han identificado polimorfismos en el gen del factor del complemento I asociados a la aparición de neovascularización miope (237).

Por otro lado, se han reportado niveles aumentados del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y disminuidos de del factor de crecimiento derivado del epitelio pigmentario (PEDF) frente a los controles emétopes, lo que sugiere que el desequilibrio entre los factores proangiogénicos y antiangiogénicos es necesario para el establecimiento de la neovascularización coroidea (239).

4.4.2.3 Maculopatía por tracción.

La maculopatía por tracción miope es un término general que comprende a un amplio espectro de trastornos relacionados, entre los que destacan la foveosquisis, el agujero macular y la mácula en forma de cúpula (240,241). En todos ellos, la presencia de estafiloma posterior en pacientes con miopía alta desempeña un papel clave en el desarrollo de la maculopatía por tracción, ya que la retina no puede seguir el alargamiento del tejido escleral del polo posterior debido a su mayor rigidez (241).

- **La foveosquisis miope:** se caracteriza por la separación progresiva de las capas retinianas, que permanecen conectadas por las células de Müller (213). El crecimiento del estafiloma posterior genera una tracción externa evidente que, en combinación con los factores que causan rigidez y la posible presencia de tracciones adicionales por adherencias vítreas, favorecen el desarrollo de la patología. La naturaleza progresiva de esta enfermedad conduce a un desprendimiento foveal y retiniano, con la consiguiente pérdida de agudeza visual (242).

Estudios recientes concluyen que los ojos con compromiso macular más grave tienen tasas de progresión más altas (242).

- **Agujero macular:** es una complicación relativamente frecuente y que se asocia con una discapacidad visual significativa. La tracción anteroposterior y tangencial ejercida por el vítreo sobre la mácula está estrechamente relacionada con el desarrollo del agujero macular en los ojos con miopía alta. Tanto el desarrollo del estafiloma posterior como el incremento en la longitud axial son parámetros clave para el desarrollo de un agujero macular en la alta miopía (213)
- **Mácula en forma de cúpula:** fue descrita por primera vez por Gaucher y colaboradores en el año 2008 en ojos miopes con discapacidad visual y cambios atróficos en el epitelio

pigmentario. En los exámenes con OCT, se observa una protuberancia en la mácula, la coroides y el epitelio pigmentario dentro del estafiloma posterior. En un alto porcentaje de casos, estas características se combinan con un desprendimiento de retina en la parte posterior de la mácula (228).

Aunque su patogenia sigue sin estar clara, los estudios recientes parecen sugerir que su desarrollo está relacionado con un engrosamiento relativo de la esclera en comparación con las áreas circundantes. También se ha sugerido que el epitelio pigmentario de la retina pueda dañarse mecánicamente como consecuencia de la nueva arquitectura dentro del estafiloma (243).

5. Modelos animales.

Dado que gran parte de los conocimientos actuales sobre la patogenia y etiología de las enfermedades se han adquirido a través de los modelos animales, estos son críticos para la investigación biomédica y el avance científico (244). En el año 1977 Wiesel y Raviola (245) descubrieron que los monos desarrollaban miopía axial como resultado de la privación de la visión al suturar sus párpados. Este importante descubrimiento estimuló el desarrollo de modelos experimentales en varias especies para comprender la base biológica de la miopía. Desde entonces se han desarrollado modelos experimentales de miopía en pollos, varias especies de primates, conejos, gatos, cobayas y ratones (107,246–250).

El conjunto de modelos han sido cruciales para dar forma a nuestra comprensión de la emetropización como un mecanismo activo y guiado visualmente para superar los errores de refracción innatos así como para entender las cascadas moleculares involucradas (251,252).

Independientemente de la especie seleccionada, todos los modelos animales de miopía se dividen en dos grandes grupos, atendiendo a la técnica experimental. Así, distinguimos:

- Modelo de miopía por inducción con lentes.
- Modelo de miopía por privación.

La miopía por privación de forma y la miopía por inducción con lentes difieren en que la primera es una condición de circuito abierto, sin un final definido, mientras que la segunda es una condición de circuito cerrado, en la que el crecimiento axial reduce el desenfoque impuesto por la lente y el crecimiento axial cesa cuando el estímulo de crecimiento se neutraliza (251).

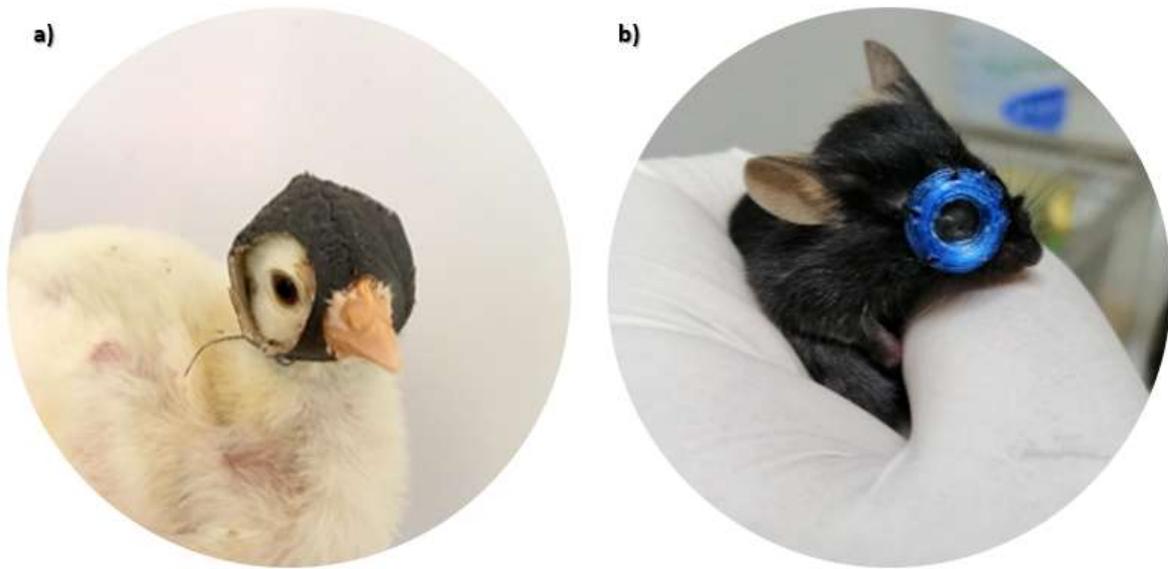


Figura 17: a) modelo de miopía por privación en pollo Cobb 500 y b) modelo de miopía por inducción con lente. Ambas imágenes han sido tomadas por Enrique García Gen en los modelos experimentales llevados a cabo en una línea de investigación adicional a la presente tesis en la Granja Docente y de Investigación de la Universidad CEU-Cardenal Herrera y el Centro Interdisciplinario de Neurociencia de Valparaíso, Chile.

5.1 El pollo: un excelente modelo de miopía.

Uno de los animales más popularmente empleados como modelo de miopía es el pollo (*Gallus gallus*) al poseer muchas características ventajosas. Tienen ojos grandes que permiten que las mediciones se realicen utilizando dispositivos diseñados para seres humanos y un amplio rango de acomodación, entre -10 y +20 D. Además, debido a que son animales diurnos, permiten la realización de estudios de una gran cantidad de moléculas importantes como la dopamina, el ritmo circadiano, etc. (253). Así mismo, su genoma completamente secuenciado, la facilidad de manejo y estabulación son ventajas adicionales que le convierten en un animal ideal para el desarrollo de un modelo de miopía (254).

5.1.1 Características anatómicas y fisiológicas de *Gallus gallus*.

El pollo es un ave diurna que depende, en gran medida, de la visión. Con un sistema visual altamente desarrollado, el ojo del pollo es relativamente grande en comparación con su tamaño total. Tiene una longitud axial media de 12-13mm, aproximadamente la mitad de la del ojo humano (254).

Al tratarse de una especie no mamífera, presenta una serie de diferencias que deben ser tenidas en cuenta a la hora de extrapolar los datos hacia la clínica humana.

1. **La córnea:** la córnea de los pollos es una estructura transparente compuesta por cinco capas, análoga a la humana si bien su diámetro y grosor son de 9.1 mm y 405 μm , por los 11.5 mm y 550 μm de la humana. Así mismo, las proporciones de las capas corneales del pollo son muy similares a las de las córneas humanas.

2. **El epitelio ciliar:** situado posteriormente al iris, está compuesto por dos músculos estriados: el anterior y los músculos esclerocorneales posteriores. Mientras que en los humanos el epitelio ciliar es el responsable de la acomodación, su papel en la acomodación aviar está todavía en debate.

Al igual que en los humanos, juega un papel fundamental en la síntesis y secreción del humor acuoso, así como proporciona soporte estructural al cristalino.

3. **El cristalino:** el cristalino de los pollos tiene un grosor aproximado de 3.5mm y un radio de curvatura de 5.9mm, en comparación con los 3.9mm de grosor y 10.5 de radio de curvatura anterior del cristalino humano. El cristalino de los pollos presenta una almohadilla anular alrededor de la corteza de la lente que sirve como punto de fijación para la musculatura ciliar, permitiendo a los músculos ciliares la aplicación directa de fuerza sobre la lente durante la acomodación aviar. La acción rápida y directa de la musculatura ciliar sobre el cristalino es la responsable del gran poder de acomodación aviar (107,254). Se estima que la velocidad de acomodación de los pollos es de 80D/s, muy superior a las 10D/s humanas (255). Además, en la acomodación aviar, los cambios en la morfología corneal representan hasta el 40% de la potencia de acomodación. La contracción de la musculatura ciliar causa un aplanamiento periférico en la córnea y un aumento de la curvatura central, ayudando al proceso de acomodación.

4. **La retina:** la retina del pollo tiene una organización similar a la de los humanos, pero carece de fovea. En su lugar presenta una región privilegiada central, situada a unos 2mm del disco óptico (256).

Las mayores diferencias se encuentran a nivel de los fotorreceptores y los pigmentos visuales. Hasta la fecha, en los pollos han sido descritos seis tipos de fotorreceptores (Figura 21). Cuatro están compuestos por conos individuales, dando lugar a una visión

tetracromática, mientras que un quinto fotorreceptor, un “doble cono”, es responsable de la percepción acromática del movimiento (257).

En cuanto a los pigmentos de los fotorreceptores, se agrupan en cinco familias: LWS (longitud de onda larga), RH (longitud de onda media), SWS2 (longitud de onda corta) y SWS1 (longitud de onda extremadamente corta). Esto constituye una clara diferencia con los humanos, puesto solo disponemos de visión tricromática. Para la visión nocturna, emplean los bastones, de modo similar a los humanos.

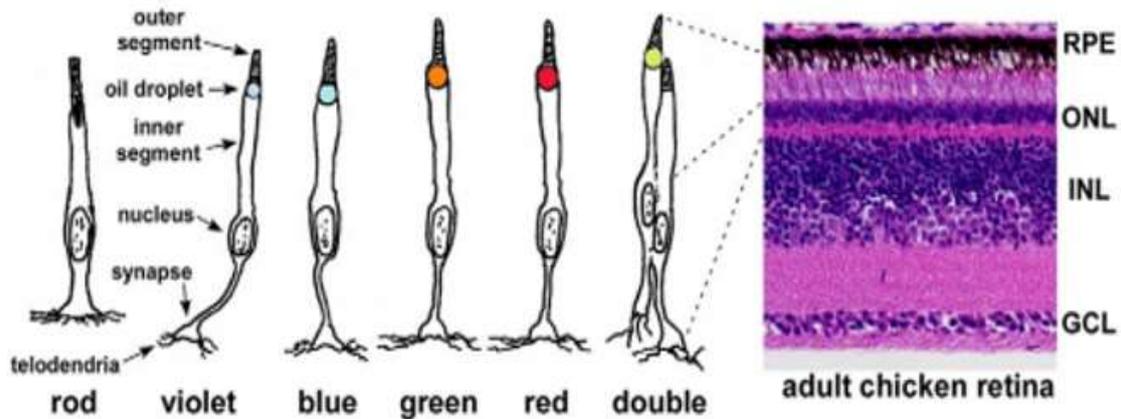


Figura 18: los pigmentos permiten clasificar los conos de los pollos: el diagrama incluye los siete tipos de fotorreceptores de la retina del pollo. En la parte superior derecha se muestra una sección teñida con hematoxilina eosina de una retina de pollo adulta (257).

Tanto las retinas humanas como las de los pollos son ricas en conos, lo que destaca la importancia de la visión en color para ambas especies. En los pollos esto se manifiesta en una relación 3:2 de cono/bastón, mientras que la retina humana exhibe una proporción de 1:20. Así mismo, la densidad de los conos en los pollos es máxima en la zona central y disminuye progresivamente hacia zonas extrínsecas (257,258).

Por último, las aves carecen de vasculatura retiniana. En su lugar, poseen un pecten oculi, el cual es exclusivo de las aves y se extiende desde el vítreo hasta el nervio óptico. Esta ausencia de vasos sanguíneos mejora la agudeza visual (254).

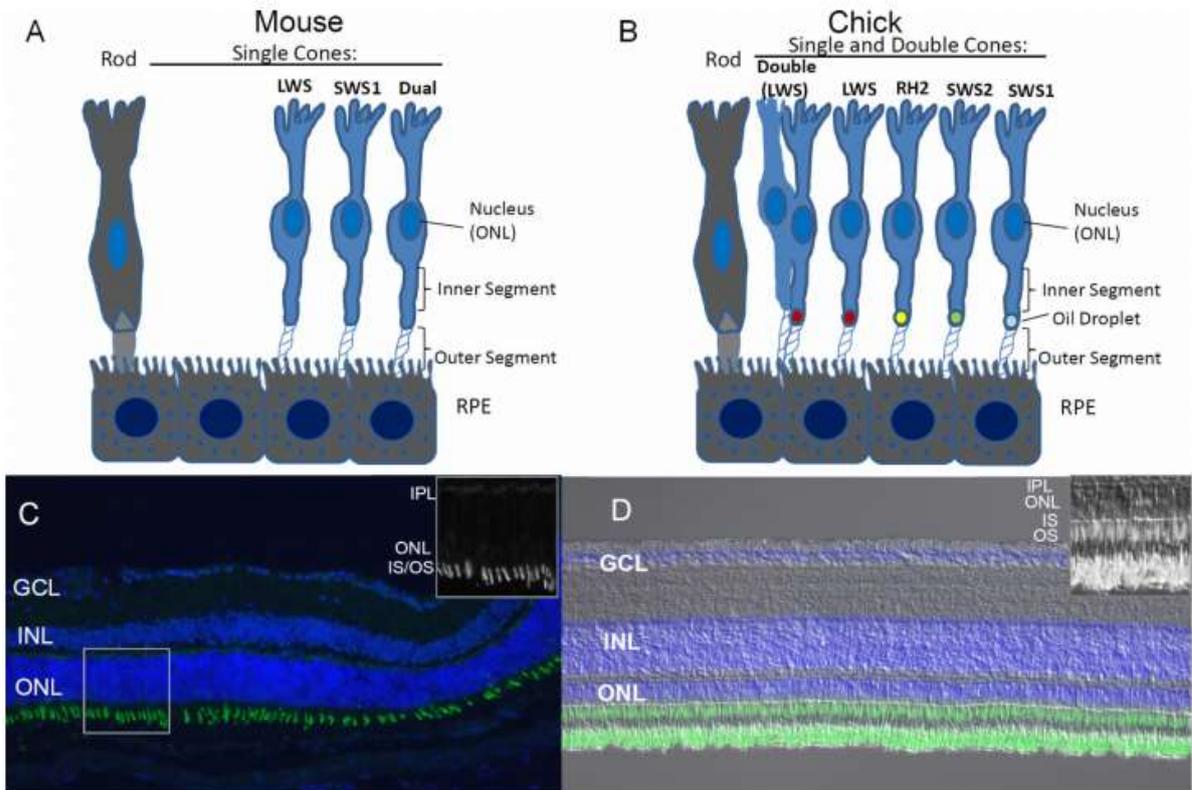


Figura 19: anatomía comparada de la retina de ratón y pollo. a) esquema de la retina dicromática del ratón; b) esquema de los fotorreceptores tetracromáticos del pollo; c) microfotografía de un ratón sano y d) retina de pollo que muestran las diferencias relativas en el espesor de la capa nuclear entre ambas especies, con una INL más gruesa en el pollo (19).

5. **La coroides:** la coroides aviar es un tejido de múltiples capas, pigmentado y bien vascularizado. Anteriormente se vuelve continua con el iris. Es el tejido responsable del suministro de oxígeno y nutrientes a la retina externa y también, es empleada como un sistema de enfriamiento, disipando el calor de la luz y los procesos metabólicos que ocurren en la retina (19).

6. **La esclera:** extendiéndose lateralmente desde el limbo, la esclerótica aviar es muy similar a la esclera de los primates. Las características distintivas incluyen la presencia de los huesecillos esclerales (157), una capa de cartílago hialino situada internamente y una capa exterior de colágeno tipo I y proteoglicanos. Ambas capas responden de manera diferente durante el crecimiento, con la capa exterior incorporando glicosaminoglicanos adicionales mientras que la capa interna se vuelve más delgada. Cabe destacar que, tanto en humanos como en el pollo, el adelgazamiento de la esclera es más pronunciada en la zona posterior.

Los osículos corneales proporcionan apoyo y protección al ojo, así como sirven de punto de fijación para la musculatura ciliar, proporcionando soporte mecánico para la acomodación corneal (254).

HIPÓTESIS

Las hipótesis planteadas a lo largo de esta tesis doctoral son las siguientes:

Hipótesis 1.

La degeneración macular característica de los pacientes con alta miopía mantiene una estrecha asociación con la desregulación del sistema del complemento, más concretamente de los factores H y D de la vía alternativa.

Hipótesis 2.

La elongación axial del globo ocular durante la progresión de la miopía alta condiciona una expresión alterada de la ruta génica inducible por hipoxia, lo cual, podría guardar relación con la expresión de factores de crecimiento y proangiogénicos relacionados con la miopía alta.

OBJETIVOS

A lo largo de esta tesis doctoral se plantean los siguientes objetivos:

- 1.** Analizar el posible efecto que el sistema del complemento, en concreto de los factores H y D de la vía alternativa, mantiene con el desarrollo de la maculopatía atrófica característica de la miopía alta a partir de muestras de humor acuoso extraídas a pacientes humanos durante la cirugía de cataratas.
- 2.** Estudiar el conjunto de factores de crecimiento activados por hipoxia y su posible asociación con el desarrollo de vasculopatías retinianas a partir del análisis de muestras de humor acuoso extraídas a pacientes humanos durante la cirugía de cataratas.
- 3.** Estudiar los niveles del factor inducible por hipoxia (HIF) a partir del análisis de muestras de humor acuoso extraídas a pacientes humanos durante la cirugía de cataratas y analizar la posible relación que este factor mantiene con el establecimiento y la progresión de la maculopatía miope.

MATERIAL Y MÉTODOS.

1. Análisis de los factores H y D del complemento en muestras de humor acuoso humano.

1.1 Extracción y manejo de las muestras.

Se realizó un estudio transversal en el que se seleccionaron 122 ojos de pacientes que fueron intervenidos por catarata en la clínica FISABIO-Oftalmológica Médica de Valencia. El estudio recibió la aprobación del Comité de Ética e Investigación clínica de FISABIO y en todo el estudio se siguió la normativa de Helsinki.

Durante la cirugía de cataratas se recogió la muestra de humor acuoso: tras la esterilización de los párpados y pestañas e instilación de povidona iodada al 5% en el fondo de saco conjuntival, se colocó el paño adhesivo estéril aislando las pestañas. Se lavó con suero la superficie ocular y se realizó una paracentesis en la zona de la incisión de la cirugía con aguja de 30G, extrayéndose por aspiración una muestra de humor acuoso en jeringa de 1cc. Luego, se procedió a la cirugía con la técnica estándar. La muestra así recogida fue introducida en un eppendorf y sometida a un proceso de congelación en nitrógeno líquido para ser posteriormente conservada hasta su utilización a -80°C .

1.2 Diseño experimental.

Los grupos experimentales fueron establecidos de acuerdo con la longitud axial del globo ocular. Ojos con una longitud axial superior a 26mm fueron clasificados como miopes altos; los ojos con una longitud axial de entre 23.5 y 25.9mm se clasificaron como miopes bajos; longitudes inferiores a 23.4mm fueron empleados como grupo control (102).

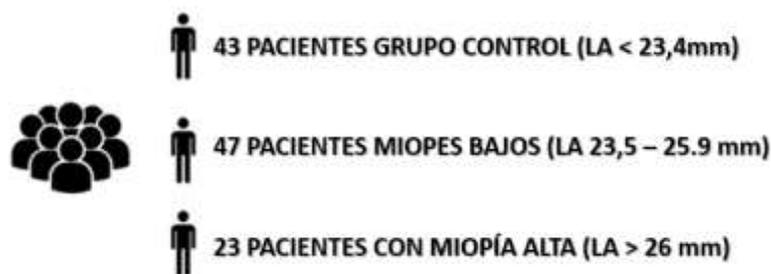


Figura 23: clasificación de los pacientes según su longitud axial en miopes altos, bajos y controles.

Los criterios de inclusión fueron los siguientes: pacientes con cataratas en estadio quirúrgico, defecto refractivo hipermetrópico inferior a +1.75D y astigmatismos menores de 2.75D. Por su parte, como criterios de exclusión fueron establecidos: patología ocular concomitante que pueda interferir con los resultados (maculopatía activa distinta de maculopatía miope, glaucoma no controlado con 2 fármacos tópicos, uveítis en cualquier estadio, oclusiones venosas o arteriales retinianas, refracción en la hipermetropía superior a +2D y astigmatismos mayores de 3D).

A todos los pacientes se les realizó una exploración oftalmológica completa incluyendo determinación de agudeza visual corregida con optotipos EDTRS, exploración del segmento anterior con lámpara de hendidura, oftalmoscopia y retinografía de campo amplio con Optos® Optomap® P200Tx para el estudio del fondo del ojo, detección y clasificación del estafiloma de acuerdo con el criterio de Curtin y clasificación de la maculopatía según la clasificación de Ávila (216). También se realizó medida de la longitud axial con interferometría (Zeiss IOL master 700®) y tomografía de coherencia óptica (Swept source optic coherence tomography SSOCT TOPCON, Tokio, Japón) para obtener medida objetiva del espesor coroideo. Esta medida se tomó de forma manual utilizando el instrumento de medida (caliper) facilitado por el software del aparato. Además, se tomaron medidas del espesor retiniano y coroideo en el punto correspondiente a la depresión foveal.

1.2.1 Detección mediante la técnica de ELISA.

Las mediciones de los factores del complemento H y D se realizaron siguiendo el protocolo optimizado de Human Adipsin ELISA kit y Human Complement Factor H ELISA kit de Cusabio.

1.2.1.1 Human Adipsin ELISA kit:

El kit ELISA de medición del factor D del complemento está diseñado para la medición cuantitativa del Factor D en muestras biológicas. Esta técnica se basa en la detección de un antígeno inmovilizado por medio de un anticuerpo específico que está enlazado a un enzima capaz de generar un producto detectable por espectrofotometría. El color desarrollado en cada pocillo es proporcional a la cantidad de CFD presente y se mide a 450nm. El rango de detección de la prueba oscila entre 15.6ng/ml y 1000ng/ml. La prueba está optimizada para un volumen de muestra de 50-100µl.

- Soluciones y reactivos empleados:
 - Placa de ensayo de 96 pocillos
 - Solución estándar
 - Anticuerpo Biotina (100X)
 - Diluyente del anticuerpo Biotina
 - Sustrato TMB
 - HRP- avidina
 - Tampón de lavado (25X)
 - Solución de parada

- Procedimiento experimental:

Se añaden 100µl de la solución estándar y las muestras en cada pocillo correspondiente y se incuba toda la placa a 37°C durante 2 horas. Posteriormente se retira el líquido de cada pocillo y se agregan 100µl de anticuerpo biotina 1X a cada pocillo, se cubre con una tira adhesiva para evitar evaporación y se incuba durante 1h a 37°C. Tras la incubación, se aspira el contenido del pocillo y se lava 3 veces con el tampón de lavado durante dos minutos cada lavado (200µl por lavado). Después del último lavado, es necesario eliminar cualquier resto del tampón de lavado, secando la placa con toallas de papel limpias. A continuación, se agregan 100µl de HRP- avidina 1X a cada pocillo y se cubre la placa con una nueva tira adhesiva, incubándose la placa durante 1 hora a 37°C. Una vez terminada la incubación, se aspira el contenido del pocillo y se agrega el sustrato TMB, para una nueva incubación de 15 minutos a 37°C. Finalmente se agregan 50µl de la solución de parada a cada pocillo y se determina la densidad óptica de cada pocillo utilizando un lector de microplacas ajustado a 450nm.

1.2.1.2 Human Complement Factor H ELISA kit.

El kit ELISA del factor H del complemento está diseñado para la medición cuantitativa del factor H del complemento en muestras biológicas por método de detección colorimétrico. Esta técnica emplea un anticuerpo de captura marcado con una etiqueta de afinidad y un anticuerpo detector conjugado que inmunocaptura el analito de la muestra. La señal finalmente generada es proporcional a la cantidad de analito presente y la intensidad se mide a 450nm.

- Soluciones y reactivos empleados:
 - Anticuerpo de captura 10X del factor H del complemento
 - Anticuerpo de detección 10X del factor H del complemento
 - Proteína liofilizada del factor H del complemento
 - Solución diluyente de anticuerpos 5BI
 - Solución diluyente de muestras NS
 - Tampón de lavado PT 10X
 - Solución TMB
 - Solución de parada

- Procedimiento experimental:

Para realizar el ensayo se agregan muestras o estándares en los pocillos, seguidos de la mezcla de anticuerpos. Tras la incubación, los pocillos se lavan para eliminar el material no unido y se agrega la solución de desarrollo TMB, generando una coloración azul. Posteriormente, la reacción se detiene mediante la adición de la solución de parada, produciendo un cambio de coloración azul a amarilla. La señal que se genera es proporcional a la cantidad de analito unido y la intensidad se mide a 450nm.

2. Análisis de las citocinas y los factores de crecimiento regulados por hipoxia en muestras de humor acuoso humano.

2.1 Extracción y manejo de las muestras.

Se realizó un estudio transversal en el que se seleccionaron 75 ojos de pacientes que fueron intervenidos por catarata en el Instituto de la Retina y Enfermedades Oculares de Valencia. El estudio recibió la aprobación del Comité de Ética e Investigación de la Universidad CEU Cardenal Herrera y en todo el estudio se siguió la normativa de Helsinki.

Durante la cirugía de cataratas se recogió la muestra de humor acuoso: tras la esterilización de los párpados y pestañas e instilación de povidona iodada al 5% en el fondo de saco conjuntival, se colocó el paño adhesivo estéril aislando las pestañas. Se lavó con suero la superficie ocular y se realizó una paracentesis en la zona de la incisión de la cirugía con aguja de 30G, extrayéndose por aspiración una muestra de humor acuoso en jeringa de 1cc. Luego, se procedió a la cirugía

con la técnica estándar. La muestra así recogida fue introducida en un eppendorf y sometida a un proceso de congelación en nitrógeno líquido para ser posteriormente conservada hasta su utilización a -80°C .

2.2 Diseño experimental.

Los grupos experimentales fueron establecidos de acuerdo con la longitud axial del globo ocular. Ojos con una longitud axial superior a 26mm fueron clasificados como miopes altos; los ojos con una longitud axial de entre 23.5 y 25.9mm se clasificaron como miopes bajos; longitudes inferiores a 23.4mm fueron empleados como grupo control.

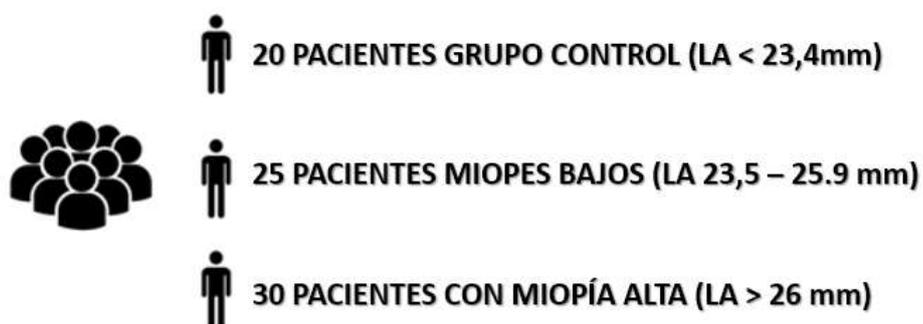


Figura 24: clasificación de los pacientes que participaron en el estudio de hipoxia. La clasificación tuvo lugar según la longitud axial del globo ocular.

Los criterios de inclusión fueron los siguientes: pacientes con cataratas en estadio quirúrgico, defecto refractivo hipermetrópico inferior a $+1.75\text{D}$ y astigmatismos menores de 2.75D . Por su parte, como criterios de exclusión fueron establecidos: patología ocular concomitante que pueda interferir con los resultados (maculopatía activa distinta de maculopatía miope, glaucoma no controlado con 2 fármacos tópicos, uveítis en cualquier estadio, oclusiones venosas o arteriales retinianas, refracción en la hipermetropía superior a $+2\text{D}$ y astigmatismos mayores de 3D).

A todos los pacientes se les realizó una exploración oftalmológica completa incluyendo determinación de agudeza visual corregida con optotipos EDTRS, exploración del segmento anterior con lámpara de hendidura, oftalmoscopia y retinografía de campo amplio con Optos® Optomap® P200Tx para el estudio del fondo del ojo, detección y clasificación del estafiloma de acuerdo con el criterio de Curtin y clasificación de la maculopatía según la clasificación de Ávila (216). También se realizó medida de la longitud axial con interferometría (Zeiss IOL master 700®) y tomografía de coherencia óptica (Swept source optic coherence

tomography SSOCT TOPCON, Tokio, Japón) para obtener medida objetiva del espesor coroideo. Esta medida se tomó de forma manual utilizando el instrumento de medida (caliper) facilitado por el software del aparato. Además, se tomaron medidas del espesor retiniano y coroideo en el punto correspondiente a la depresión foveal.

2.2.1 Detección de citoquinas y factores de crecimiento relacionados con hipoxia.

Las citocinas y los factores de crecimiento juegan un papel importante en procesos muy diversos como la inmunidad innata, la apoptosis, la angiogénesis, el crecimiento y la diferenciación celular. Están involucrados en complejas interacciones entre células, respuestas celulares a condiciones ambientales, así como en la mayoría de los procesos de la enfermedad.

El método tradicional para la detección y cuantificación de las citocinas y factores de crecimiento es el ELISA. En este método, la proteína objetivo se inmoviliza en una superficie sólida junto con un anticuerpo vinculado a una enzima que genera un producto detectable. Si bien este método tradicional es óptimo para la detección de una sola proteína, el procedimiento general requiere de un volumen relativamente alto de muestra para cada proteína, lo cual es limitante para aquellos ensayos en los que se quieren estudiar varias citocinas.

Las innovaciones en la tecnología de Microarrays en los últimos años han permitido desarrollar nuevas matrices de anticuerpos, permitiendo estudiar varias de ellas de manera simultánea con un volumen de muestra reducido. La matriz Quantibody® está basada en un sándwich ELISA multiplexado que permite la determinación precisa de la concentración de múltiples citocinas de manera simultánea.

2.2.1.1 Human Custom Quantibody ArrayS

De manera similar a un ELISA, el multiarray emplea un par de anticuerpos específicos de citocinas para la detección. Primero un anticuerpo de captura se une a la superficie de vidrio y, tras la incubación con la muestra, la citocina objetivo es atrapada en la superficie sólida. Tras este paso, se agrega un segundo anticuerpo de detección marcado con biotina y el complejo citocina-anticuerpo-biotina es visualizado mediante la adición del colorante Cy3 conjugado con estreptavidina, usando un escáner de láser.

El portaobjetos de vidrio de la prueba se divide en 16 pocillos de matrices de anticuerpos de citocina idénticas. Cada anticuerpo, junto con los controles positivos se agrupa por

cuadruplicado. El cristal incluye una junta extraíble que aísla cada pocillo y permite el estudio de 16 muestras en cada diapositiva de manera segura.

- Soluciones y reactivos empleados:
 - Custom Array Glass Slide (RayBiotech, Peachtree Corners, USA)
 - Quantibody® Sample Diluent (RayBiotech, Peachtree Corners, USA)
 - Tampón de lavado I 20X (RayBiotech, Peachtree Corners, USA), Lot #Q0362719.
 - Tampón de lavado II 20X (RayBiotech, Peachtree Corners, USA), Lot # 0411119
 - Custom Array Lyophilized Standard Mix (RayBiotech, Peachtree Corners, USA)
 - Custom Array Biotinylated Antibody Cocktail (RayBiotech, Peachtree Corners, USA)
 - Cy3 equivalent dye-conjugated Streptavidin (RayBiotech, Peachtree Corners, USA)
 - Slide Washer/Dryer (RayBiotech, Peachtree Corners, USA)
 - Film adhesivo (RayBiotech, Peachtree Corners, USA)

- Procedimiento experimental:

El Slide almacenado a -80°C se atempera durante 2h a temperatura ambiente. Durante este tiempo, se preparan las diluciones de las citoquinas estándar que serán empleadas para la elaboración de las rectas patrón. Para ello, se reconstituye el estándar liofilizado añadiendo 500 μl de diluyente. A continuación, se pipetea 100 μl de Std1 al Std2 y así sucesivamente hasta el Std7. Para el control negativo, se pipetea 100 μl de diluyente únicamente.

Una vez atemperado el Slide, se pipetea 100 μl de diluyente en cada pocillo y se incuba durante 30 minutos para bloquear el Slide. Posteriormente, se decanta el contenido y se añaden 100 μl de las muestras y los estándares de la prueba, incubándose durante 2h a temperatura ambiente. A continuación, se retira el contenido de los pocillos y se realizan 5 lavados de 5 minutos cada uno con el tampón de lavado 1 y 2 lavados de 5 minutos con el tampón de lavado 2.

Tras los lavados se procede a la incubación con el cóctel de anticuerpos. Primero se procede a la reconstitución del anticuerpo de detección añadiendo 1.4ml de diluyente al anticuerpo de detección biotinilado y se añaden 80 μl del cóctel a cada pocillo, incubándose durante 1-2h a temperatura ambiente. Una vez terminada la incubación, se retira el contenido de cada pocillo y se realizan 5 lavados con 150 μl del tampón de lavado 1 y 2 lavados adicionales de 150 μl con

el tampón de lavado 2. Una vez realizados los lavados, se añaden 80 μ l de Cy3 conjugado con streptavidin en cada pocillo y se incuba durante 1h en oscuridad.

Finalmente, se decanta el contenido de los pocillos y se realizan 5 lavados de 150 μ l con el tampón de lavado 1, se desmonta el Slide y se hace un lavado final de 30 minutos con el tampón de lavado 1 a temperatura ambiente y en agitación suave antes de analizar la señal final a través de un escáner Axon GenePix. Para la extracción de los datos del análisis de fluorescencia se emplea el archivo GAL facilitado por la casa comercial (GenePix, ScanArray Express).

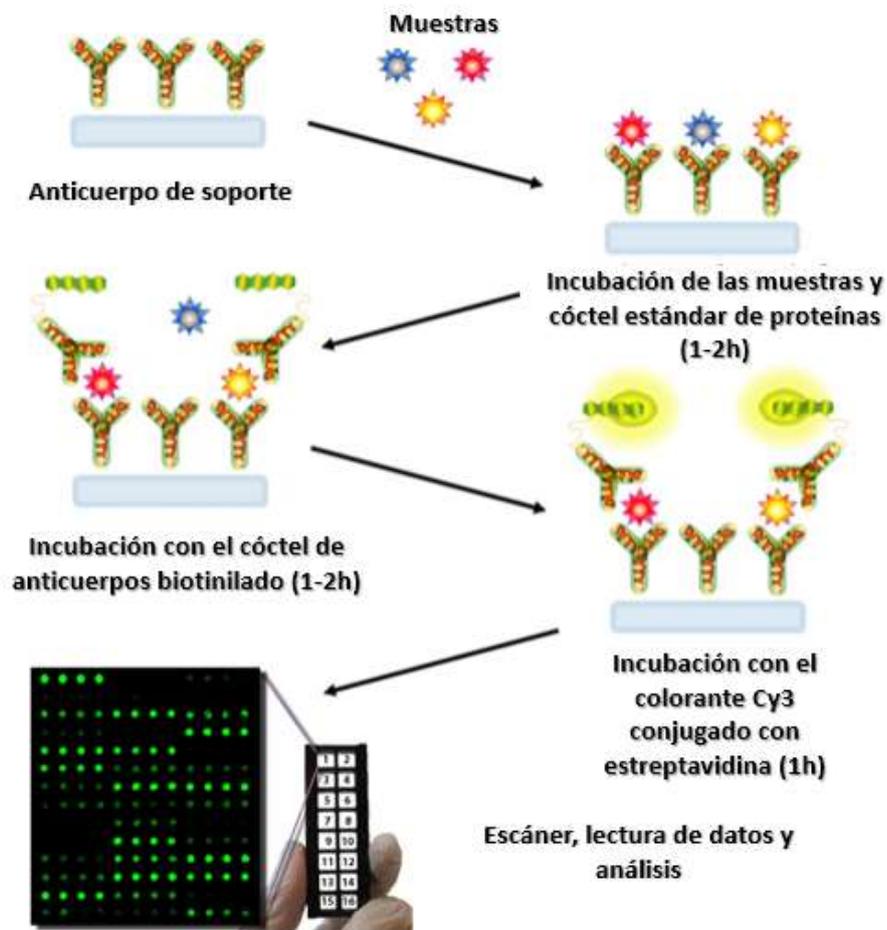


Figura 25: esquema general del procedimiento de análisis mediante Multiarray.

3. Tratamiento estadístico de los resultados.

El análisis estadístico de los resultados se ha realizado empleando el paquete estadístico SPSS versión 24.0 (IBM Corp. 2016 para Windows, Versión 24.0 Armonk, NY: IBM Corp., EE.UU.) y GraphPad Prism versión 7.04 para Windows (GraphPad Software, La Jolla, CA, EE.UU.). Así mismo, a lo largo del estudio se han establecido intervalos de confianza del 95% y 99% para el estudio de significatividad, indicándose con * para $p < 0.05$ y ** para $p < 0.01$.

A lo largo de los tres estudios realizados en la tesis (análisis del complemento, estudio de factores inducidos por hipoxia y factores de crecimiento), el estudio de la normalidad de la distribución se ha llevado a cabo mediante la prueba de Komogorov-Smirnov, con un intervalo de confianza del 95%. Por su parte, el análisis de las varianzas se realizó mediante la prueba de Levene.

Para el estudio de los factores del complemento H y D en muestras de humor acuoso se realizó un ANOVA de los datos encontrados por la prueba de Levene tomando el test de Tukey como análisis post hoc siempre que indicada homogeneidad de varianzas ($p < 0.05$). De manera similar, para aquellas variables que no presentaban homogeneidad de varianzas se realizó el test de Kruskal-Wallis como análisis no paramétrico. Una vez determinadas las diferencias de medias entre los grupos y para examinar la fuerza de asociación entre variables, se analizaron las correlaciones de Pearson o Spearman, con un nivel de significación de $p < 0.01$.

Por otro lado, para el análisis de los factores de crecimiento e interleucinas inducidos por hipoxia en pacientes con miopía alta a partir de muestras de humor acuoso, se realizó un ANOVA de los datos encontrados por la prueba de Levene tomando el test de Tukey como análisis post hoc siempre que se cumpliera homogeneidad de varianzas y el test de Kruskal-Wallis para aquellas variables cuyas varianzas eran heterogéneas. Una vez determinadas las diferencias de medias entre parámetros, se realizaron análisis de correlación de Pearson o Spearman con la finalidad de conocer la fuerza de asociación entre las variables del estudio y los parámetros clínicos de cada paciente, todo ello con un nivel de significación de $p < 0.05$.

RESULTADOS.

1. Análisis del sistema del complemento en muestras de humor acuoso humano.

Con la finalidad de analizar el posible papel del sistema del complemento en el desarrollo de la miopía se realizó un estudio de investigación transversal en el que se seleccionaron 122 ojos de pacientes intervenidos por catarata en la clínica FISABIO-Oftalmológica Médica de Valencia, analizando mediante ELISA los factores H y D del complemento a partir de muestras de humor acuoso de ojos miopes y controles.

1.1 Características clínicas de los pacientes objeto de estudio.

En la tabla 4 se pueden observar las características clínicas generales de todos los pacientes que han participado en el estudio. Los datos se muestran como media \pm desviación típica. Los grupos experimentales fueron establecidos de acuerdo con su longitud axial en miopes altos (LA > 26mm), miopes bajos (LA de entre 23.5- 25.9mm) y controles de emetropía (LA < 23.4mm).

El estudio contó con una población total de 122 muestras, distribuidas en 43 controles, 47 ojos con miopía baja y 32 con miopía alta. Las edades medias (años) fueron de (75.6 \pm 6.9) para el grupo control; (73.4 \pm 10.3) para el grupo de miopía baja y de (66.4 \pm 12.5) para el grupo de alta miopía. La distribución de sexos dentro de cada grupo ha sido homogénea (tabla 4).

Las medidas referentes a la longitud axial y a los espesores retiniano y coroideo en el punto correspondiente a la depresión foveal fueron realizadas con interferometría (Zeiss IOL master 700®) y tomografía de coherencia óptica (Swept source optic coherence tomography SS-OCT TOPCON, Tokio, Japón) respectivamente. Esta medida se tomó de forma manual utilizando el instrumento de medida (caliper) facilitado por el software del aparato. En los valores referentes al espesor macular, se observa un aumento significativo en el grupo de miopía alta (273.7 \pm 39.4* μ m) frente a los grupos de miopía baja (256.8 \pm 26.5 μ m) y control (261.1 \pm 30.9 μ m). Por su parte, los valores referentes al espesor coroideo muestran una notable reducción entre el grupo de miopía alta (128.4 \pm 101.3* μ m), el grupo de miopía baja (199.2 \pm 78.0* μ m) y el grupo control (237.1 \pm 64.0 μ m), con diferencias significativas entre los 3 grupos. Las diferencias de medias (*) han sido establecidas con un nivel de significación de p<0.01.

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES DEL ESTUDIO								
	N	SEXO %	LA (mm)	EQ. ESFÉRICO	ESP. MACULAR (μm)	ESP. COROIDEO (μm)	FH (ng/ml)	FD (ng/ml)
CONTROL	43	VARÓN 37.2%	22.6±0.4	-1±0.9	261.1±30.9	237.1±64.0	22.7±5.9	52.8±19.9
		MUJER 62.8%						
BAJA MIOPIA	47	VARÓN 44.7%	24.1±0.6	-3.3±3.4	256.8±26.5	199.2±78.0 [#]	22.9±10.5	53.2±20.7
		MUJER 55.3%						
ALTA MIOPIA	32	VARÓN 43.8%	28.1±1.9	-10±5.8	273.7±39.4 [*]	128.4±101.3 [*]	27.2±15.5 [*]	50.7±12.6
		MUJER 56.3%						

tabla1. Características clínicas de los 122 ojos que participaron en el estudio. Las diferencias significativas (*) indican diferencias de medias entre el grupo de miopía alta frente al grupo control; (#) indica diferencias significativas entre el grupo de miopía baja y el grupo control; ambas se establecieron con una significación de p<0.01. Lista de abreviaturas: LA: longitud axial del globo ocular; EQ. Esférico: equivalente esférico; ESP. Macular: espesor macular; ESP: coroideo: espesor coroideo; FH; factor H del sistema del complemento y FD: factor D del complemento.

A lo largo del estudio se determinó la presencia/ausencia de estafiloma posterior y se procedió a su clasificación. Para ello, a todos los pacientes se les realizó una exploración oftalmológica completa incluyendo determinación de agudeza visual corregida con optotipos EDTRS, exploración del segmento anterior con lámpara de hendidura, oftalmoscopia y retinografía de campo amplio con Optos® Optomap® P200Tx para el estudio del fondo del ojo, detección y clasificación del estafiloma de acuerdo con el criterio de Curtin. La distribución de los estafilomas varió notablemente entre los tres grupos experimentales. El grupo control se caracterizó por una ausencia total de estafiloma posterior. En el grupo de miopía baja, la mayoría de los ojos presentaron ausencia de estafiloma, un 6.52% de los ojos presentaron estafiloma de tipo 1 y 3, y un 2.17% estafiloma de tipo 5. Por su parte el grupo de miopía alta presentó una gran variedad de estafilomas (Tabla 5).

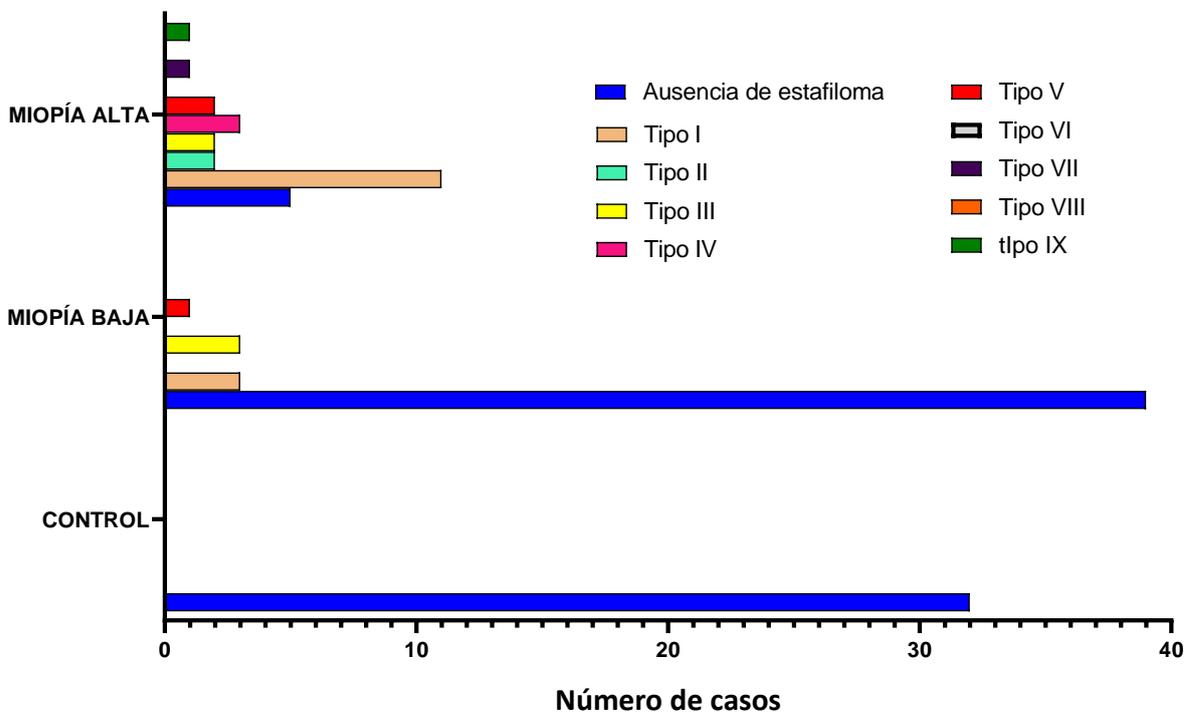


Figura 26: representación gráfica de la distribución de casos de estafiloma posterior en los ojos del estudio. Se puede observar una mayor incidencia y diversidad de estafiloma en el grupo de miopía alta frente a los grupos de miopía baja y control.

	TIPO DE ESTAFILOMA SIGUIENDO EL CRITERIO DE CURTIN									
	AUSENCIA	TIPO I	TIPO II	TIPO III	TIPO IV	TIPO V	TIPO VI	TIPO VII	TIPO VIII	TIPO IX
CONTROL	32	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MIOPÍA BAJA	39	3	0	3	0	1	0	0	0	0
MIOPÍA ALTA	5	11	2	2	3	2	0	1	0	1

tabla2. Distribución de los estafilomas en los ojos de estudio siguiendo la clasificación de Curtin. Se observa una clara asociación entre el desarrollo de estafiloma posterior y la miopía alta.

	GRADO DE MACULOPATÍA SIGUIENDO LA CLASIFICACIÓN DE ÁVILA					
	ASPECTO NORMAL	MOSAICISMO	ESTAFILOMA POSTERIOR	ESTRÍAS DE LACA	ATROFIA COROIDEA	NEOVASCULARIZACIÓN
CONTROL	30	2	0	0	0	0
MIOPÍA BAJA	33	6	7	0	0	0
MIOPÍA ALTA	1	3	7	5	7	4

tabla3. Distribución del grado de maculopatía en los ojos del estudio siguiendo la clasificación de Ávila. Se observa un claro predominio del aspecto normal en el grupo control, en comparación con la gran diversidad de maculopatías presentes en el grupo de miopía alta.

Para el análisis del grado de maculopatía desarrollado por los pacientes se siguió la clasificación de Ávila (216) con 6 grados de degeneración macular (M₀-M₅) (Tabla 6). Al igual que sucedió con el tipo de estafiloma, el grado de maculopatía varió notablemente entre los grupos experimentales. El grupo control se caracteriza por una ausencia de maculopatía en la mayoría de los pacientes (93.75% de los controles presentan aspecto normal y un 6.25% mosaicismo). Por su parte, en el grupo de miopía baja el 73.71% de los pacientes presentan aspecto normal (M₀), mosaicismo el 13,04% de los casos y el 15.21% estafiloma posterior. Finalmente, el grupo de miopía alta se caracteriza por una mayor variedad de maculopatías tal y como muestra la tabla 6 y la figura 31.

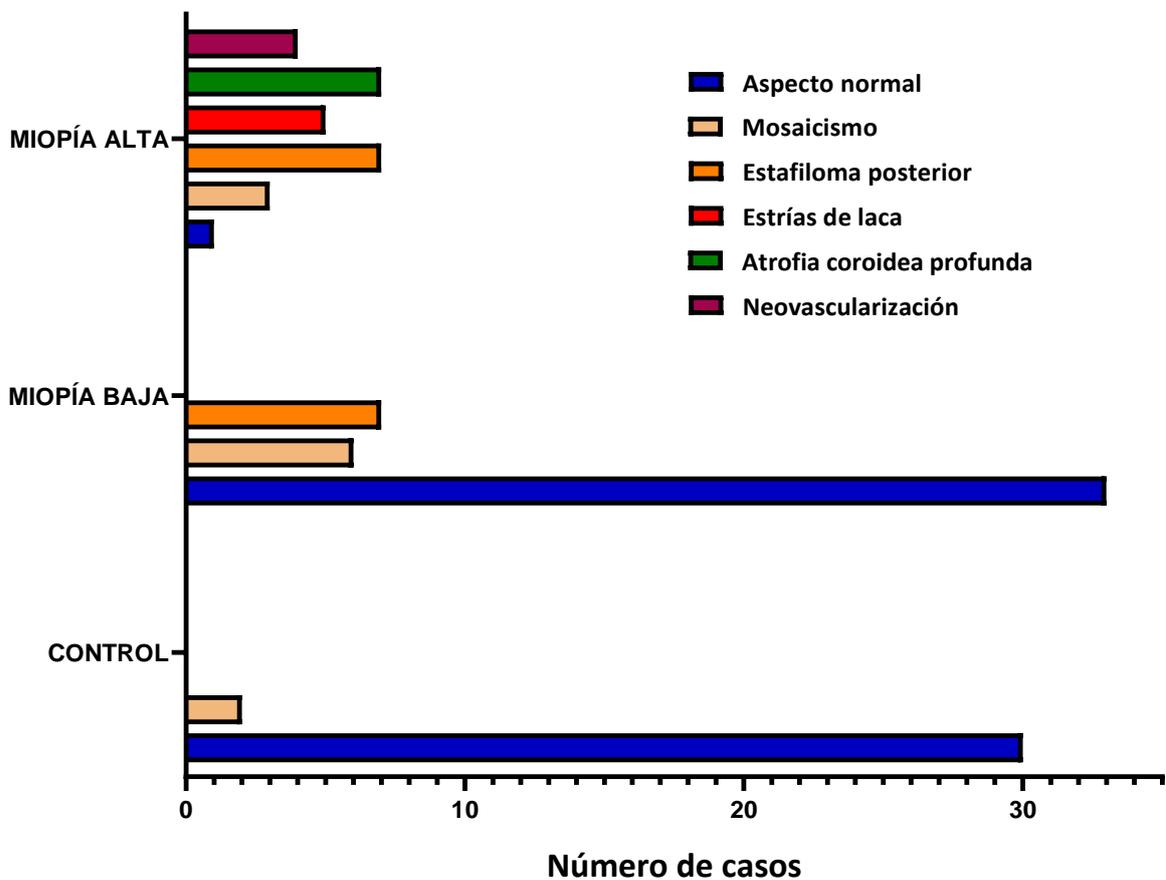


Figura 27: representación gráfica de la distribución del grado de maculopatía entre los grupos experimentales control, baja miopía y alta miopía. Se puede observar una mayor incidencia y variedad de la maculopatía miope en el grupo de miopía alta en comparación con el grupo de miopía baja.

1.2 Aumento significativo de concentración de FH en el grupo de miopía alta.

Una vez medida la concentración de los factores H y D del complemento mediante ELISA a partir de muestras de humor acuoso, se analizaron las diferencias de medias obtenidas entre los tres grupos experimentales mediante un ANOVA de un factor. En la figura 28 se muestra el aumento significativo en los niveles del factor H del complemento en el grupo de miopía alta respecto al grupo de miopía baja y control ($p < 0.01$). De manera análoga procedimos a estudiar el factor D del complemento, cuyos valores no manifestaron diferencias significativas entre los grupos experimentales ($p > 0.05$).

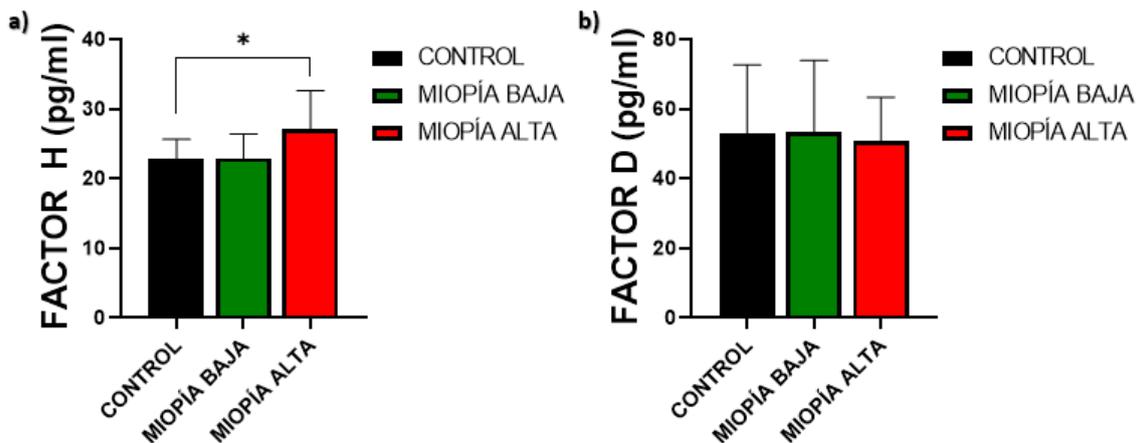


Figura 28: a) concentración media del factor H del complemento en humor acuoso; b) concentración media del factor D del complemento. Las barras de error representan la desviación típica de la media. Las diferencias significativas (*) fueron establecidas con un nivel de significación de $p < 0.01$

1.3 Reducción significativa del espesor coroideo en el grupo de miopía alta.

El análisis de medias ANOVA para el espesor coroideo y macular reflejó una reducción significativa en el espesor coroideo de los pacientes con miopía alta frente a los pacientes con miopía baja y control, con un nivel de significación de $p < 0.01$. Por su parte, el espesor macular no reflejó diferencias significativas ($p > 0.05$).

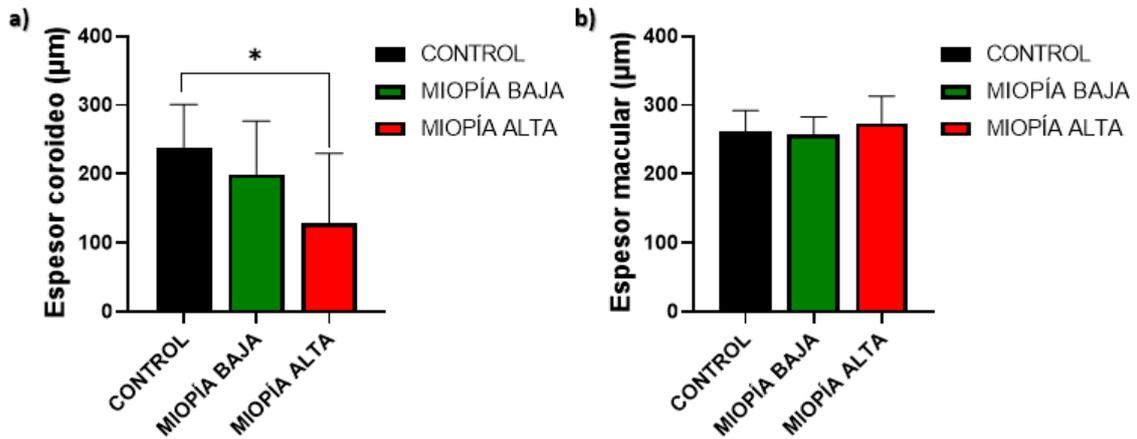


Figura 29: a) cuantificación de los espesores coroides y macular mediante OCT: a) representación gráfica del valor medio del espesor coroides en los grupos experimentales de miopía alta, baja y control; b) representación gráfica del espesor macular medio determinado en los grupos experimentales por medio de OCT. Las barras de error muestran la desviación típica de la media. Las diferencias significativas (*) fueron establecidas con un nivel de significación de $p < 0.01$.

1.4 Correlación entre la longitud axial del globo ocular y el espesor coroides.

El análisis de correlación de Pearson entre el espesor coroides y la longitud axial del globo ocular mostró que ambos parámetros se correlacionan de manera inversa con una R de Pearson de $R = -0.516$ y una significación de $p < 0.01$ (Figura 34). Los pacientes con miopía alta se caracterizan por tener una mayor longitud axial ($LA > 26\text{mm}$) y grosores coroides inferiores a los medidos en los ojos con miopía baja y sus correspondientes controles de emetrópia. Dicho adelgazamiento coroides se hace cada vez más evidente a medida que el eje axial alcanza valores más extremos.

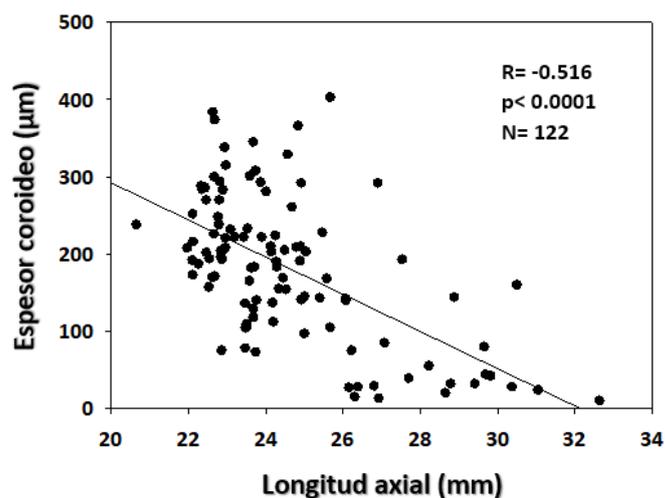


Figura 30: correlación de Pearson entre el espesor coroides y la longitud axial del globo ocular. Ambas variables se correlacionan de manera inversa, con una $R = -0.516$ y una significación de $p < 0.01$.

1.5 Correlación entre la longitud axial y los niveles del complemento.

El análisis de correlación de Spearman entre la longitud axial del globo ocular y la concentración del factor H del complemento en humor acuoso muestra una correlación alta y positiva entre ambos parámetros ($R=0.728$, $p<0.01$). De forma general, se observa una tendencia ascendente entre la longitud axial y los niveles obtenidos de dicho factor del complemento, pues al estirarse el globo ocular los valores obtenidos del factor H fueron incrementándose progresivamente (Figura 35).

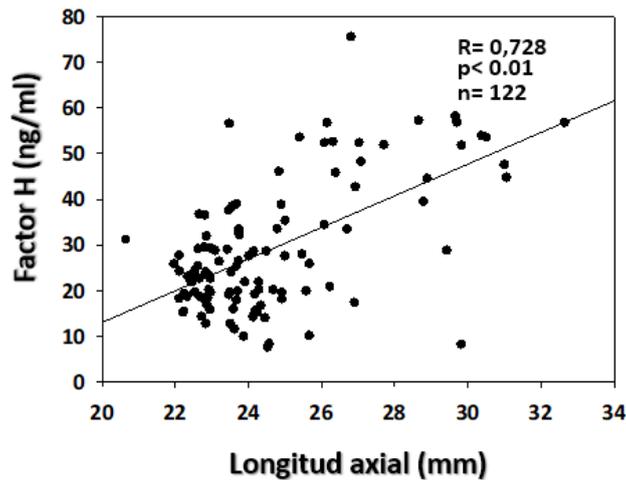


Figura 31: Análisis de correlación de Spearman entre la Longitud axial del globo ocular determinada mediante OCT y la concentración factor H del complemento determinada mediante ELISA con una significación de $p<0.01$. Ambas variables mantienen una correlación positiva y alta ($R=0.728$).

1.6 Correlación entre el espesor coroideo y el FH.

El análisis de correlación de Spearman entre el espesor coroideo y la concentración del factor H del complemento concluyó, con un nivel de significación de $p<0.01$ que el factor H del complemento se correlaciona de manera inversa con el espesor coroideo ($R=-0.624$) (Figura 36).

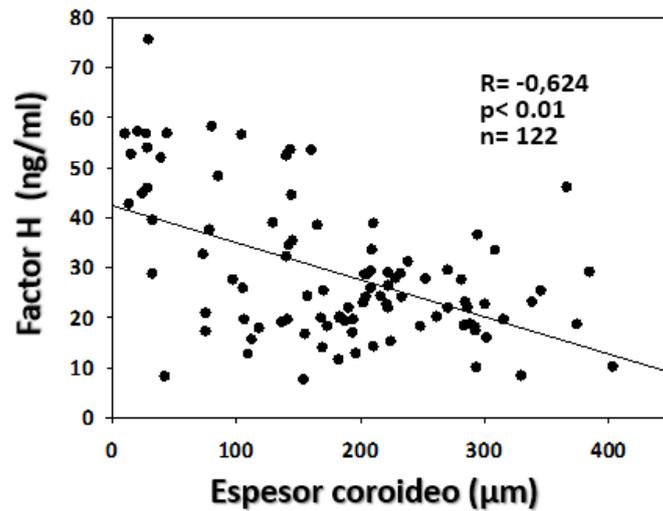


Figura 32: análisis de correlación de Spearman entre la concentración del Factor H del complemento y el espesor coroideo determinada con un nivel de significación de $p < 0.01$. Ambas variables mantienen una correlación inversa, de manera que aumentos en una variable determinan una disminución en los valores de la otra y viceversa ($R = -0.624$).

1.7 El estiramiento axial del ojo condiciona la progresión de la maculopatía.

A lo largo del estudio también se analizó la relación establecida entre la longitud axial del globo ocular y la presencia de maculopatía miope. La figura 37 representa la longitud axial media característica de cada grado de maculopatía. En ella se observa un aumento significativo en la longitud axial media de los pacientes que padecen estrías de laca en comparación con sus ojos equivalentes con aspecto normal. Así mismo, los ojos con atrofia coroidea profunda y neovascularización presentan una longitud axial media significativamente superior a los ojos con aspecto normal. El análisis de medias se realizó por medio de un ANOVA de un factor y las diferencias significativas se establecieron con un nivel de significación de $p < 0.01$.

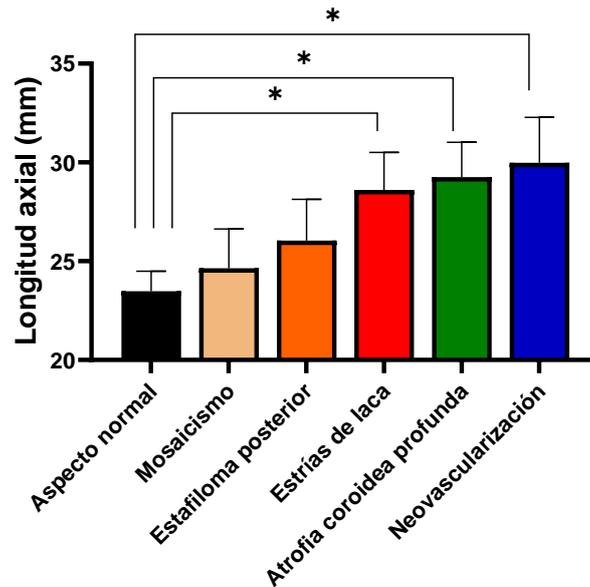


Figura 33: Representación gráfica del análisis de medias ANOVA de la longitud axial para cada tipo de maculopatía desarrollada por los pacientes del estudio. Las diferencias de medias () fueron establecidas con un nivel de significación de $p < 0.01$. Las barras de error representan la desviación típica de la media.*

1.8 La reducción del espesor coroideo favorece la progresión de la maculopatía.

El espesor coroideo presenta una reducción significativa en el grupo de miopía alta respecto a los grupos de miopía baja y control (Tabla 4). Posteriormente, analizamos las diferencias de medias en el espesor coroideo medio de cada grado de maculopatía por medio de un análisis ANOVA, observándose una clara reducción de espesor en los pacientes que presentaban estrías de laca y neovascularización con una significación de $p < 0.01$. Aunque para el desarrollo de estafiloma posterior y atrofia coroidea profunda el análisis ANOVA no reflejó diferencias significativas ($p > 0.05$), sí se observa una clara tendencia de reducción del espesor coroideo, la cual puede ser confirmada aumentando el número de pacientes del estudio.

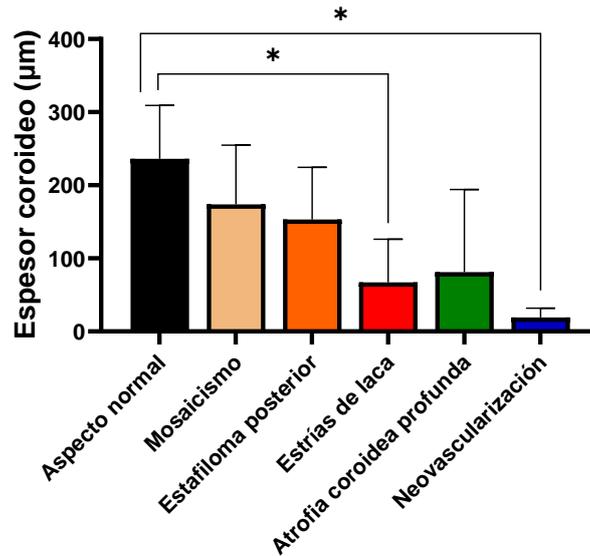


Figura 34: representación gráfica del esesor coroideo medio determinado por OCT del conjunto de maculopatías que presentan los pacientes del estudio. Las diferencias de medias (*) fueron analizadas con una significación de $p < 0.01$ y las barras de error muestran la desviación típica de la media.

1.9 La mayor concentración de FH condicionan un mayor grado de maculopatía.

En la figura 39 demostramos incrementos significativos en los niveles del factor H del complemento en el grupo de miopía alta frente a los grupos de miopía baja y control. Posteriormente analizamos los valores medios del factor H para cada grado de maculopatía observado en los pacientes por medio de un análisis ANOVA, reflejando incrementos significativos en el grupo de pacientes con atrofia coroidea profunda y neovascularización frente a los pacientes cuyo fondo del ojo tiene un aspecto normal. Dicho análisis fue establecido con un nivel de significación de $p < 0.01$.

Por su parte, si bien el análisis estadístico no mostró diferencias significativas ($p > 0.05$) en el grupo de pacientes con estrías de laca, se observa una cierta tendencia que deberá ser abordada en análisis posteriores en los que se aumente la población de estudio.

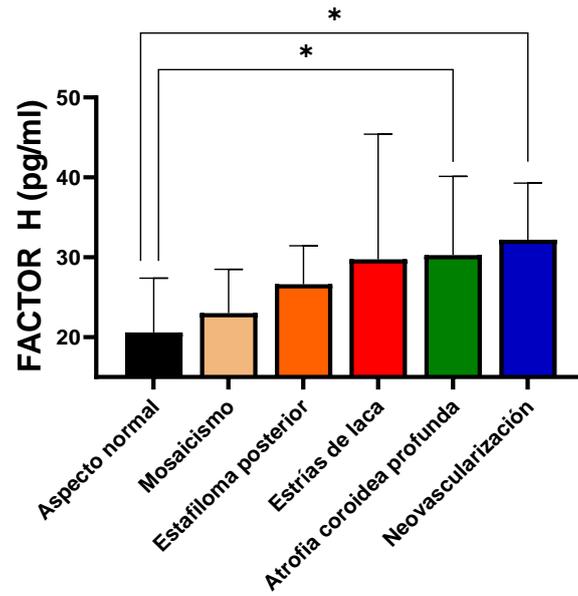


Figura 35: representación gráfica de la concentración media del factor H del complemento para cada una de las maculopatías presentes a lo largo del estudio. Las diferencias de medias (*) fueron establecidas con un nivel de significación de $p < 0.01$. Las barras de error muestran la desviación típica de la media.

2. Estudio de los productos activados por hipoxia en humor acuoso humano.

Para analizar el papel que desempeña la hipoxia y los factores de crecimiento activados por esta condición se realizó un estudio de investigación transversal en el que se seleccionaron 75 ojos de pacientes intervenidos por catarata en el Instituto de la Retina y Enfermedades Oculares de Valencia, analizando mediante multiarray el factor inducible por hipoxia 1α (HIF- 1α), el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), las interleucinas IL-6 e IL-17, el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-BB) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en humor acuoso de ojos miopes y controles.

2.1 Características clínicas de los pacientes del estudio.

En la tabla 7 se pueden observar las características clínicas generales de todos los pacientes que han participado en el estudio. Los datos se muestran como media \pm desviación típica. Los grupos experimentales fueron establecidos de acuerdo con su longitud axial en miopes altos (LA > 26mm), miopes bajos (LA de entre 23.5- 25.9mm) y controles de emetropía (LA < 23.4mm). Las edades medias (años) fueron de 75.6 ± 6.9 para el grupo control; 73.4 ± 10.3 para el grupo de miopía baja y de 66.4 ± 12.5 para el grupo de alta miopía.

El estudio contó con una población total de 75 muestras, distribuidas en 20 controles, 25 ojos con miopía baja y 30 muestras de ojos con miopía alta. Las medidas referentes a la longitud axial y a los espesores retiniano y coroideo en el punto correspondiente a la depresión foveal fueron realizadas con interferometría (Zeiss IOL master 700®) y tomografía de coherencia óptica (Swept source optic coherence tomography SSOCT TOPCON, Tokio, Japón) respectivamente. Esta medida se tomó de forma manual utilizando el instrumento de medida (caliper) facilitado por el software del aparato. En los valores referentes al espesor coroideo se observa una reducción significativa en el grupo de miopía alta ($115.1\pm 85.1^*\mu\text{m}$) frente a los grupos de miopía baja ($188.6\pm 99.9^*\mu\text{m}$) y control ($234.8\pm 56.4\mu\text{m}$), con diferencias significativas entre los 3 grupos. Las diferencias de medias (*) han sido establecidas con un nivel de significación de $p < 0.01$.

	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES			
	N	EDAD (años)	LA (mm)	Esp. Coroideo (µm)
CONTROL	20	75.6±6.9	22.8±0.6	234.8±0.6
MIOPÍA BAJA	25	73.4±10.3	24.5±1.0 [#]	188.7±99.9
MIOPÍA ALTA	30	66.4±12.5	29.1±3.1 [*]	115.1±85.1 [*]

tabla4. Descripción clínica de los 75 pacientes seleccionados para el estudio de factores de crecimiento e interleucinas inducidas por hipoxia. Los resultados se expresan como media ± desviación típica. Las diferencias de medias (*) fueron establecidas con una significación de p<0.05 entre el grupo de miopía alta y los grupos de miopía baja y control; Por su parte, (#) indica diferencias significativas entre el grupo de miopía baja y control con una significación de p<0.05

	CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS PACIENTES						
	N	HIF- 1α	HGF	VEGF	PDGF-BB	IL-6	IL-17
CONTROL	20	71.1±23.3	179.90±108.58	383.96±287.49	194.88±71.32	38.84±164.30	0.48±1.86
BAJA MIOPÍA	25	53.1±14.2 [*]	235.52±188.96 [#]	396.76±264.29	226.45±106.13	18.17±34.58	0.26±0.99
ALTA MIOPÍA	30	46.7±10.3 [*]	377.30±281.83 [*]	154.03±151.75 [*]	264.56±96.59 [*]	82.14±197.46	0.43±2.15

tabla5. Concentraciones medias de cada metabolito separadas por los grupos experimentales de miopía alta, baja y control de emetropía. Los resultados se expresan como media ± desviación típica. Las diferencias de medias (*) fueron establecidas con una significación de p<0.05 entre el grupo de miopía alta y control: (#) indica diferencias significativas entre el grupo de miopía baja y control.

2.2 Distribución de las concentraciones de los marcadores en los grupos experimentales y su relación con el desarrollo de la maculopatía miope.

2.2.1 Aumento significativo de la concentración de HGF en pacientes con miopía alta, especialmente en aquellos que desarrollan atrofia coroidea profunda.

Una vez determinada la concentración de los factores de crecimiento a partir de las muestras de humor acuoso, se analizaron las diferencias de medias obtenidas entre los tres grupos experimentales mediante un análisis HSD de Tuckey y una prueba adicional de T3 de Dunnet. Dichos análisis reflejaron un aumento significativo en la concentración del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) en el grupo de miopía alta respecto al grupo de miopía baja y control con un nivel de significación $p < 0.05$. Por su parte, el grupo de miopía baja también presenta un incremento significativo ($p < 0.05$) respecto al grupo control (Figura 36a). Para conocer la relación que HGF mantiene con el eje axial del globo ocular, realizamos un análisis de correlación de Spearman entre dicho factor de crecimiento y la longitud axial del globo ocular, cuya nube de puntos está representada en la figura 36b. Ambos parámetros mantiene una correlación de $r = 0.349$, con un nivel de significación de $p < 0.01$, de forma que se observa que una mayor elongación axial del globo ocular (típico de los ojos miopes) se asocia a mayores niveles de HGF.

Por otro lado, al analizar las concentraciones obtenidas de HGF en función del grado de maculopatía desarrollado por el paciente, se observa un aumento significativo en el grupo de pacientes que desarrollan atrofia coroidea ($p < 0.05$) respecto al resto de pacientes con aspecto normal, mosaicismo y estafiloma posterior (Figura 36c). Además, se observa una tendencia al alza en los valores de HGF a medida que progresa la maculopatía, lo cual precisa de comprobaciones adicionales y aumentar la población de estudio.

En cuanto a la relación que HGF mantiene con los demás factores de crecimiento del estudio, destacamos la correlación inversa con el factor de crecimiento endotelial vascular y la correlación positiva y alta que HGF mantiene con el factor de crecimiento derivado de plaquetas ($r = 0.594$, $p < 0.05$).

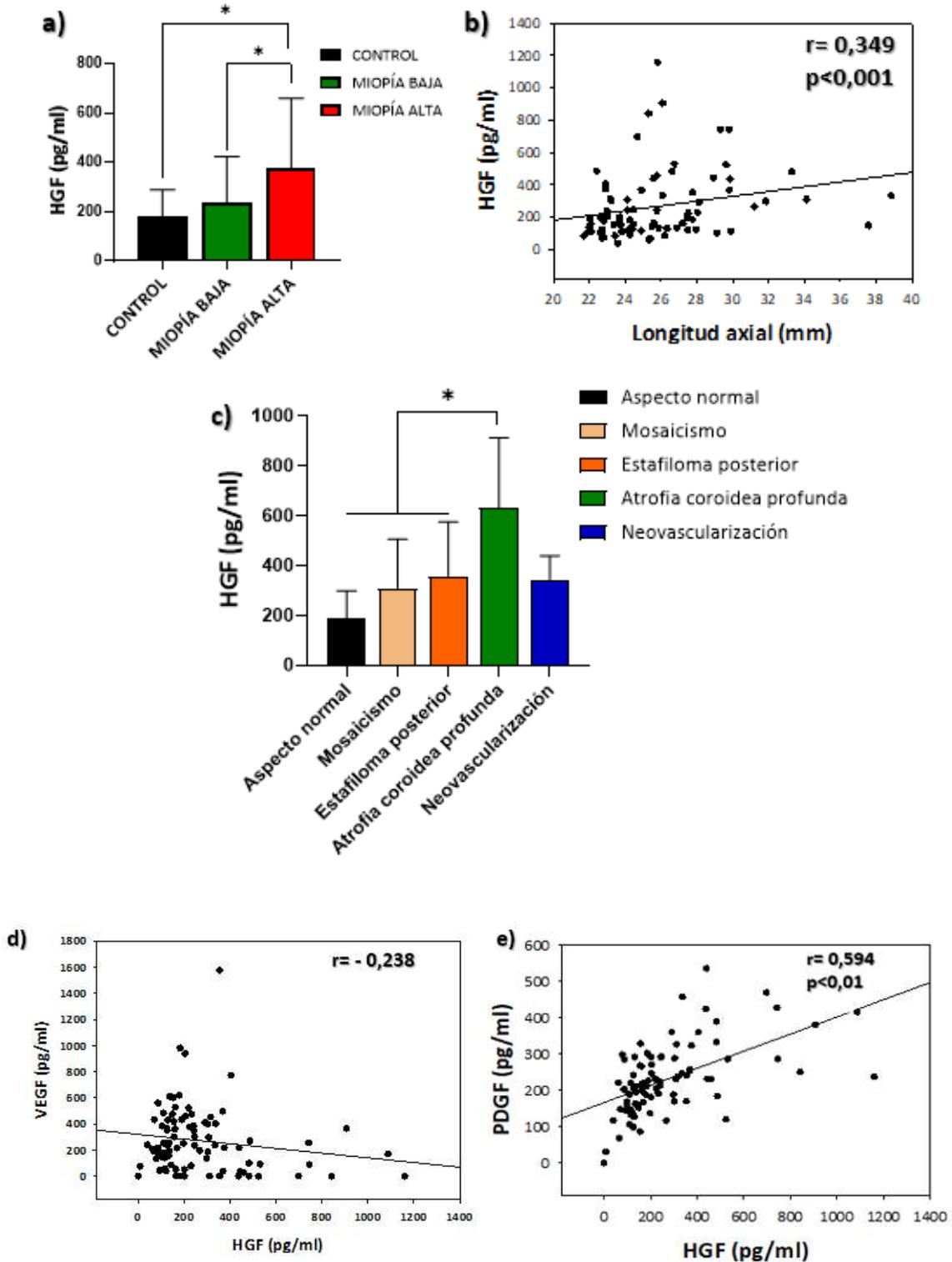


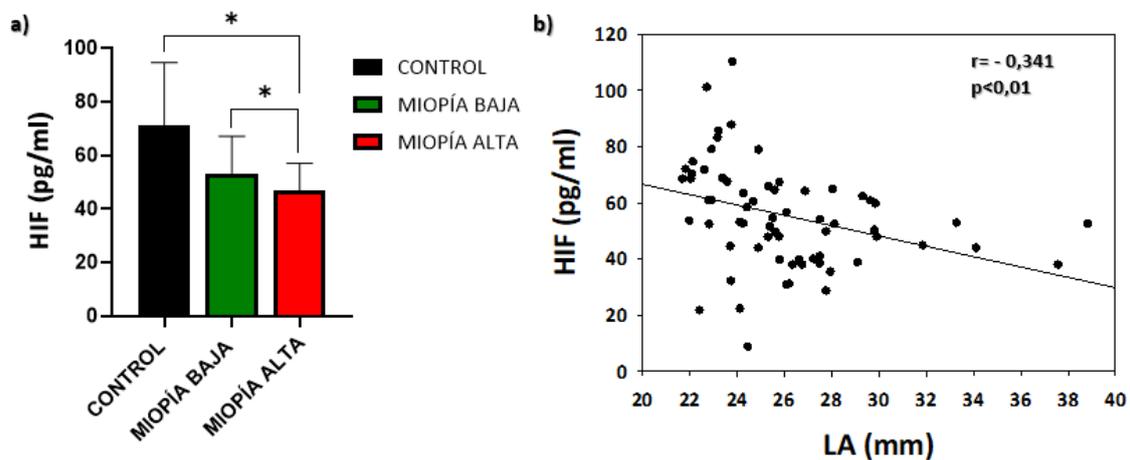
Figura 36: a) representación gráfica de la concentración media del factor de crecimiento de hepatocitos en los tres grupos experimentales. Las diferencias de medias (*) se establecen con un nivel de significación de $p < 0.05$. Las barras de error muestran la desviación típica de la media; b) análisis de regresión entre el HGF y la longitud axial del globo ocular. Ambos parámetros mantienen una $r = 0.349$, $p < 0.01$; c) representación gráfica de la concentración media de HGF en función del grado de maculopatía desarrollado por el paciente. Las diferencias de medias (*) se establecen con un nivel de significación de $p < 0.05$. Las barras de error muestran la desviación típica de la media; d) análisis de correlación de Pearson entre VEGF y HGF; e) análisis de correlación de Pearson entre el factor de crecimiento derivado de plaquetas y el HGF. Ambas variables mantienen una correlación positiva y alta ($p < 0.01$).

2.2.2 Regulación a la baja de HIF a medida que avanza el grado de miopía.

El análisis de medias HSD de Tuckey reflejó una reducción significativa en el grupo de miopía alta frente al de miopía baja y este, a su vez, respecto al grupo control con un nivel de significación de $p < 0.05$ (Figura 37a).

Adicionalmente y para conocer la distribución de concentraciones de HIF en función de la longitud axial del globo ocular de cada paciente realizamos un análisis de correlación de Pearson con un nivel de significación de $p < 0.01$. Dicho análisis mostró que ambas variables mantienen una correlación alta y negativa, es decir, que a mayor longitud axial menores concentraciones de HIF hallaremos experimentalmente ($r = -0.341$, $p < 0.01$) (Figura 37b).

Por otro lado, estudiamos la relación que los valores encontrados de HIF mantenían con sus equivalentes de HGF y VEGF con la finalidad de estudiar la relación entre ambas variables. Para ello, realizamos un análisis de Pearson entre HIF y HGF (Figura 37c), demostrando que ambas variables mantienen una correlación negativa y alta ($r = -0.322$, $p < 0.05$). Por su parte, el análisis de correlación entre HIF y VEGF mostró que ambas variables mantienen una correlación positiva, de manera que menores niveles de expresión de HIF condicionan una menor concentración de VEGF ($r = 0.261$, $p < 0.05$).



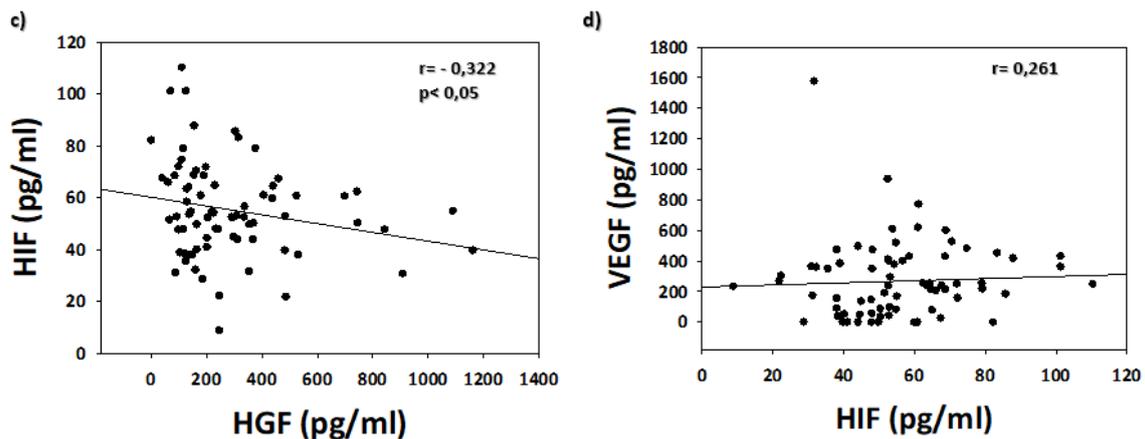


Figura 37: a) representación gráfica de la concentración del factor inducible por hipoxia 1 alfa en los grupos experimentales de miopía alta, baja y controles de emetropía. Las diferencias de medias (*) se establecieron con un nivel de significación de $p < 0.05$ y las barras de error muestran la desviación típica de la media; b) recta de regresión y nube de puntos entre el HIF y la longitud axial del globo ocular, con una r de -0.341 , $p < 0.05$; c) análisis de correlación de Pearson entre el factor inducible por hipoxia y el HGF con un grado de significación de $p < 0.05$; d) análisis de correlación entre el HIF y el VEGF.

2.2.3 Regulación a la baja de VEGF a medida que avanza el grado de miopía.

Por su parte, el factor de crecimiento endotelial vascular presenta una reducción significativa en los niveles encontrados en el grupo de miopía alta ($154.03 \pm 151.75^* \text{pg/ml}$) en comparación con los niveles hallados en el grupo de miopía baja ($296.76 \pm 264.29 \text{pg/ml}$) y control ($383.96 \pm 287.49 \text{pg/ml}$) con un nivel de significación de $p < 0.05$. A su vez, el grupo de miopía baja presenta un incremento significativo respecto al grupo control ($p < 0.05$) (Figura 38a).

Además, realizamos un análisis de correlación de Spearman entre el VEGF y la longitud axial del globo ocular. De dicho análisis revela que ambas variables se correlacionan de manera alta y negativa, con una $r = -0.480$, $p < 0.01$, de manera que una mayor elongación del globo ocular determina valores progresivamente menores del factor de crecimiento endotelial vascular (Figura 38b).

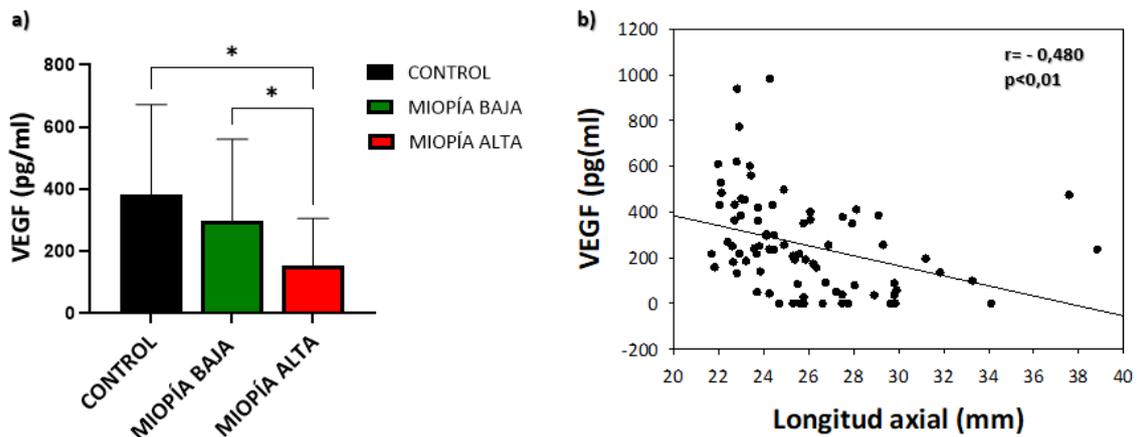


Figura 38: a) representación gráfica de la concentración media del factor de crecimiento endotelial vascular en los grupos de miopía alta, baja y control. El análisis de medias HSD de Tuckey mostró una reducción significativa de la concentración de VEGF en el grupo de miopía alta en comparación con los grupos de miopía baja y control. Las diferencias de medias (*) fueron establecidas con un nivel de significación de $p < 0,01$ y las barras de error muestran la desviación típica de la media; b) análisis de correlación de Spearman entre el VEGF y la longitud axial del globo ocular, con una $r = -0,480$, $p < 0,01$.

2.2.4 Ausencia de cambios significativos en los niveles de PDGF-BB entre grupos.

El último de los factores de crecimiento estudiados ha sido el factor de crecimiento derivado de plaquetas, el cual es necesario para la estabilización de los vasos en formación y evitar fugas y sangrado. Si bien se observa un cierto incremento en el grupo de miopía alta (264.5 ± 96.5 pg/ml) respecto al grupo de miopía baja (226.4 ± 106.1 pg/ml) y control (194.8 ± 71.3 pg/ml), la gran variabilidad de los resultados precisa de comprobaciones adicionales y un aumento de la población del estudio para poder determinar cambios en la concentración de este factor de crecimiento (Figura 39a).

También realizamos un análisis de correlación de Spearman entre el PDGF y la longitud axial del ojo para conocer la relación establecida entre ambos parámetros. Ambas variables no mantienen una correlación significativa, con una $r = 0,170$, $p = 0,131$, $n = 75$ de manera que, aunque el grupo de miopía alta presenta concentraciones mayores que el grupo control, los niveles de PDGF no se correlacionan bien con la elongación axial (Figura 39b).

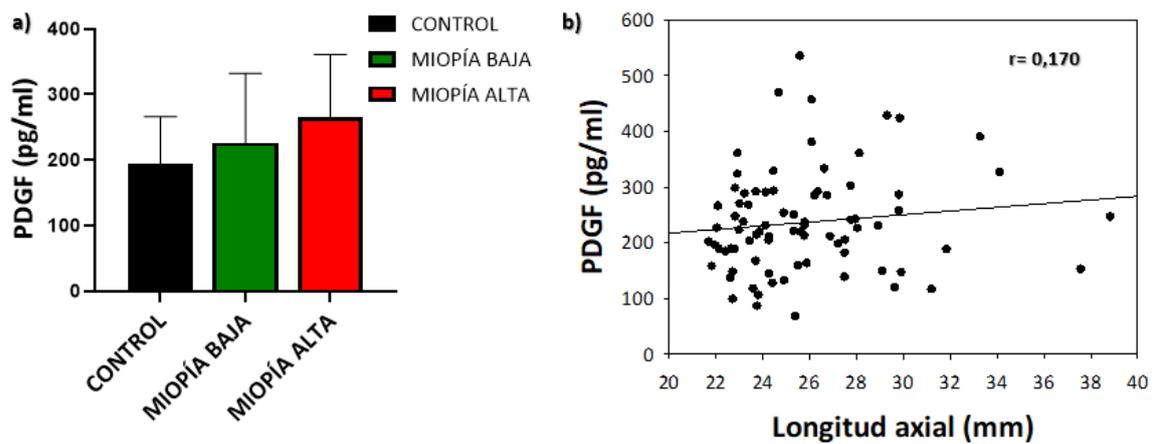


Figura 39: a) representación gráfica de la concentración media del factor de crecimiento derivado de plaquetas en los grupos de miopía alta, baja y control. Las diferencias de medias (*) se establecieron con un nivel de significación de $p < 0.05$ y las barras de error muestran la desviación típica de la media; b) análisis de correlación de Spearman entre el PDGF y la longitud axial del globo ocular.

2.2.5 No hay diferencias significativas en los niveles de IL-6 e IL-17 entre grupos.

Además de los factores de crecimiento anteriormente mencionados y del factor inducible por hipoxia, a lo largo del estudio hemos estudiado la distribución de las concentraciones de las interleucinas IL-6 e IL-17 en los grupos de alta y baja miopía y el grupo control de emetropía. En la Figura 44a se pueden apreciar que la distribución de la concentración media de la IL-6 no presenta diferencias significativas entre los grupos experimentales.

Por lo que respecta a la IL-17 el análisis de medias no reflejó diferencias significativas entre los grupos experimentales (Figura 40). Además, la mayor parte de las concentraciones medidas de la IL-17 se mantuvieron por debajo del límite de detección de la prueba, por lo que su distribución entre los grupos de miopía y control deberá ser analizada por medio de una prueba diagnóstica diferente con mayor sensibilidad.

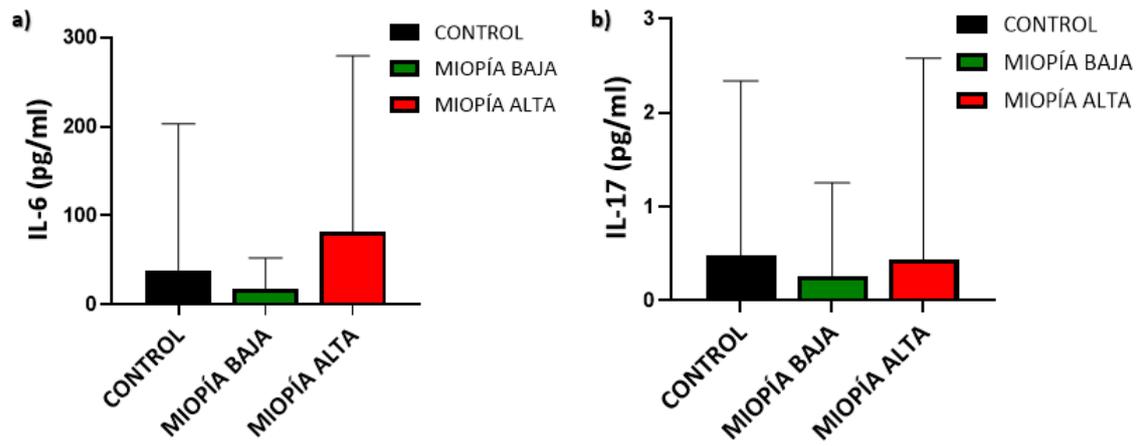


Figura 40: a) representación gráfica de la concentración de interleucina 6 entre los grupos experimentales. No se observan diferencias significativas entre los grupos; b) representación gráfica de las concentraciones medias de IL-17 en los grupos experimentales. No se observan diferencias significativas entre grupos.

DISCUSIÓN.

La miopía es el desorden visual más común en todo el mundo (86). Es una enfermedad multifactorial causada por una compleja interacción entre factores genéticos y ambientales que causan un desajuste entre la longitud axial del globo ocular y las lentes que lo componen generando imágenes borrosas de los objetos situados a cierta distancia del observador (63,75–78,84). Su distribución varía notablemente entre las distintas poblaciones, alcanzando su mayor prevalencia en las países asiáticos (67,68,259). Actualmente, en Europa su prevalencia es del 24.3% (260). Sin embargo, en las últimas décadas su prevalencia estandarizada por grupos de edad ha aumentado del 17,8% entre los nacidos entre 1910 y 1939 al 23,5% en los nacidos entre 1940 y 1979. Este aumento es incluso más evidente entre los jóvenes europeos actuales, en los que alcanza una prevalencia del 47,2%, todo ello favorecido por los cambios sociales y en el estilo de vida sucedidos en las últimas décadas tales como la mayor presión educativa, la reducción de actividades al aire libre, la mayor exposición a pantallas, etc. Se espera que para el año 2050 el 49,8% de la población mundial esté afectada por miopía, de los cuáles, el 9,8% padecerán la variedad de miopía alta (76,260,261).

Tradicionalmente se ha definido a la miopía alta como una miopía con un error de refracción superior a las -6D y una longitud axial del globo ocular superior a los 26mm (235). Sin embargo, lejos de tratarse de una simple miopía con más dioptrías y una longitud axial del globo ocular mayor, la miopía alta se caracteriza por la presencia de cambios degenerativos en el segmento posterior que involucran a la esclerótica, el disco óptico, la coroides, la membrana de Bruch, el epitelio pigmentario de la retina y a la propia retina(2). A nivel molecular, presenta un contexto diferente con alteraciones en la expresión de factores inducidos por hipoxia, desajustes en la expresión de factores de crecimiento relacionados con el crecimiento ocular y el estrés oxidativo, así como una sobreactivación del complemento. Todo ello, incrementa la susceptibilidad del paciente a padecer otras enfermedades oculares graves tales como cataratas, desprendimientos de retina, atrofia coroidea, etc. (213).

A lo largo de esta tesis doctoral hemos realizado dos estudios clínicos a partir de muestras de humor acuoso humano. En el primero de ellos se determinaron las concentraciones de los factores H y D del complemento mediante ELISA y se analizó la posible asociación que ambos factores mantienen con el establecimiento de la maculopatía miope. En el segundo estudio, se abordó el conjunto de factores de crecimiento e interleucinas cuya síntesis y secreción se ve favorecida por la situación de hipoxia generada en el polo posterior como consecuencia del estiramiento axial del ojo miope. La combinación de ambos estudios nos ha permitido obtener una visión integrada del proceso patológico subyacente a la miopía alta: cómo la elongación axial del globo ocular genera una situación de isquemia que condiciona el aporte de oxígeno y

nutrientes a la retina, situación a la que este tejido responde incrementando la expresión de factores proangiogénicos e inflamatorios con el objetivo de restablecer la situación de normoxia. El brote anómalo de nuevos vasos y la inflamación aberrante ocasionada genera daño tisular y, en última instancia, el establecimiento de la maculopatía miope, con pérdida de visión.

Una de las principales limitaciones a la hora de estudiar patologías oculares en pacientes humanos es el acceso a la muestra. En nuestro caso, las muestras empleadas en ambos han sido extracciones de humor acuoso durante la cirugía de cataratas. En este sentido, el desarrollo reciente de plataformas analíticas como la cromatografía de gases (GC), la cromatografía líquida (LC), la electroforesis capilar (CE) asociada a espectroscopía de masas (MS) y la resonancia magnética nuclear (NMR) han permitido estudiar con mayor profundidad los eventos metabólicos que dirigen el crecimiento ocular y la degeneración retiniana a través del análisis del humor acuoso de los pacientes (262–264).

1. La miopía alta se asocia a una alteración de la expresión de los factores reguladores de la vía alternativa del complemento.

En los últimos años, el interés por el estudio del sistema del complemento y los factores proangiogénicos ha resurgido debido a la publicación de diversos trabajos en los que se documenta su implicación en diversas enfermedades. En cooperación con otros sistemas inmunes y fisiológicos, el complemento integra la inmunidad innata y adaptativa. Su activación se desencadena por medio de mecanismos distintos dependiendo de la vía que involucre (clásica, alternativa y lectinas). Todas ellas convergen en la formación de la convertasa C3, que da como resultado la formación de los productos de activación C3a y C3b, C5a y el complejo de ataque de membrana C5b-9. Entre sus funciones media la eliminación de restos celulares y apoptóticos participa en el desarrollo tisular normal, en el crecimiento de las masas tumorales y en los estados patológicos tales como el síndrome urémico hemolítico o la degeneración macular asociada a la edad.

La eficacia de su funcionamiento depende del control fino de su activación. Cuando está desregulado o sobreactivado el complemento pasa de ejercer funciones homeostáticas a patológicas, impulsando diversos trastornos inflamatorios e, incluso, cáncer, lo que refleja la naturaleza multifacética del complemento (209,265). La vía alternativa permanece constantemente activa a través de la hidrólisis constitutiva de baja velocidad del tioéster interno de C3 (191). Entre los factores que la regulan se encuentra el factor H, sintetizado en el ojo por el nervio óptico, la esclera, el epitelio pigmentario de la retina, el epitelio ciliar y el cristalino

(198). Su función principal es la inactivación de C3b, impidiendo la amplificación de la cascada. Por otro lado, el factor D es un factor implicado en la activación de la vía del complemento que actúa sobre la convertasa C3 (192,266).

En etapas tardías, la miopía alta cursa neovascularización y atrofia coroidea similar a la atrofia geográfica típica de enfermedades como la degeneración macular asociada a la edad (DMAE), lo que sugiere que ambas patologías podrían tener sistemas moleculares similares como desencadenantes de dicha clínica común. La DMAE es una enfermedad multifactorial compleja, caracterizada en sus etapas iniciales por la presencia de acumulaciones de lipoproteínas en la membrana de Bruch, observadas como drusas en los exámenes fundoscópicos. Los estudios genéticos realizados han identificado varios componentes de la cascada del complemento en dichos depósitos, lo que sugiere que la DMAE puede deberse a un proceso de inflamación aberrante que incluye una activación inadecuada del complemento (173,265). En particular, la variante común H402 del factor del complemento H se asocia con una mayor predisposición a padecer DMAE por medio de mecanismos todavía desconocidos (267). Por su parte, la evidencia del factor D en la patogenia de la DMAE incluye lo siguiente: en un modelo con deficiencia genética del factor D, los ratones estaban desprotegidos contra la degeneración de los fotorreceptores mediada por estrés oxidativo y un aumento de la activación sistémica del complemento, incluido el factor D, fue detectado en el suero de pacientes con DMAE en comparación con los controles (209).

Por lo tanto, las alteraciones de los factores H y D del complemento se han relacionado con la DMAE atrófica y su forma final, la atrofia geográfica. Esta variante de la DMAE cursa con atrofia progresiva de la coroides seguida de atrofia retiniana y pérdida de visión. Proceso similar, en cierto modo, a la atrofia coriorretiniana típica de la miopía alta. Por ello, el análisis de los factores H y D del complemento en el humor acuoso en pacientes con miopía alta resulta una herramienta útil y de bajo coste para estudiar y comprender la implicación e importancia del sistema del complemento en el establecimiento de la degeneración macular típica de la miopía alta.

1.1 La miopía alta se asocia con una regulación al alza del CFH y éste, a su vez, con el desarrollo de la maculopatía miope.

A lo largo de este estudio hemos correlacionado los niveles del factor H del complemento medidos en el humor acuoso de 122 pacientes con la atrofia coriorretiniana miope central, para lo cual clasificamos la maculopatía en función del fondo de ojo y de la medida objetiva del

espesor coroideo central. Nuestros resultados demuestran la asociación entre los niveles significativamente elevados del factor H del complemento y la miopía alta (Figura 31a) con un nivel de significación de ($p < 0.01$). Así mismo, el factor H del complemento se correlaciona de manera inversa y alta con el espesor coroideo ($R = -0.624$, $p < 0.01$, $n = 122$) (Figura 32) y, a la vez, el factor H del complemento incrementa sus niveles a medida que progresa la maculopatía miope, hallando concentraciones significativamente elevadas en los ojos con atrofia coroidea profunda y neovascularización frente a los ojos con aspecto normal (Figura 35). Sorprende la relación encontrada, ya que nuestros hallazgos sugieren que el factor H aumenta su concentración cuanto más evolucionada está la enfermedad, es decir, cuando hay más atrofia en el epitelio pigmentario.

El factor H es producido constitutivamente por el hígado, así como por una amplia variedad de tipos celulares como linfocitos de la sangre periférica, mioblastos, células endoteliales, células gliales y neuronas (199). La retina muestra una síntesis extrahepática del complemento, siendo el epitelio pigmentario una de las fuentes principales de este factor en el ojo, probablemente para superar el acceso restringido de proteínas plasmáticas a la retina a través de la barrera hematorretiniana.

CFH es una proteína plasmática abundante que se compone de 20 dominios. Su función es la de promover la inactivación de C3b mediada por el Factor I uniéndose a C3b predominantemente a través de los dominios 1-4 en el extremo N-terminal de la molécula de CFH. Actúa como cofactor del Factor I tanto en fase fluida como en la superficie celular, así como en la membrana de Bruch, uniéndose a los glicosaminoglicanos como el heparán sulfato. Se ha demostrado que los dominios 6-8 y 19-20 desempeñan un papel importante en la unión del heparán sulfato, lo que resulta en una conformación que permite que los dominios 1-4 interactúen con C3b. También se ha demostrado que los dominios 7 y 20 son importantes para facilitar la unión de CFH al malondialdehído, el cual es un subproducto de peroxidación lipídica característico de los depósitos típicos de la DMAE y también encontrado en la miopía alta (268–270). La unión de CFH al malondialdehído inhibe la amplificación del sistema del complemento al promover la escisión de C3b en fragmentos iC3b inactivos (271). En este sentido, ya hemos mencionado que la variante H402Y de CFH muestra una unión significativamente disminuida al heparán sulfato y a las moléculas de la malondialdehído y una pérdida de capacidad para inactivar a C3b. Todo ello proporciona una explicación de cómo este polimorfismo conduce a la desregulación de la vía alternativa del complemento (272).

Por tanto, una posible explicación a nuestros hallazgos es que el incremento en la concentración del factor H del complemento en pacientes con miopía alta se deba a un incremento de su síntesis por las otras estructuras y tejidos oculares que también son productores de factor H: la esclera, la retina, el nervio óptico y el epitelio ciliar y que este incremento de la concentración se produzca de manera espontánea para bloquear la acción del factor C3b, impidiendo la amplificación de la cascada del complemento (272,273).

El CFH tiene efectos antioxidantes y reguladores de la apoptosis mediante un mecanismo dependiente de caspasa sobre las células del epitelio pigmentario de la retina bajo situación de estrés nitrosativo. También bloquea los efectos proinflamatorios del malondialdehído, un producto mayoritario de peroxidación lipídica y protege contra el estrés oxidativo en modelos de ratón.

En un estudio reciente, nuestro grupo ha evidenciado estrés nitrosativo en el humor acuoso de pacientes con miopía alta. La nitración de la tirosina es un tipo único de modificación postraduccional que ocurre en el contexto de inflamación y estrés nitrosativo (271). En DMAE, se ha demostrado la presencia de nitrotirosina inmunorreactiva en el CFH, lo cual, potencia la secreción de la citocina proinflamatoria y angiogénica IL-8 a partir de monocitos que han sido estimulados con productos de peroxidación lipídica. Estos hallazgos sugerían fuertemente que el CFH nitrado contribuye a la progresión de la DMAE ya que bajo condiciones de estrés nitrosativo la forma reducida del CFH tiene un papel protector, mientras que su forma oxidada tiene un papel patológico como activador de la vía alternativa (271). Otra posible explicación es la existencia de un cambio de función en el FH mediada por estrés oxidativo/nitrosativo de manera que este pase de ejercer funciones homeostáticas a patológicas. (271,274).

Nuestros hallazgos concuerdan así con los estudios recientemente publicados que estudian la implicación del complemento en la atrofia geográfica de la degeneración macular asociada a la edad (DMAE), similar a la atrofia coroidea desarrollada en la miopía alta, sugiriendo que ambas patologías podrían tener sistemas moleculares similares que desencadenan una clínica común (275).

Estas dos aportaciones son las más notables del estudio, puesto que, si bien está ampliamente descrito en la bibliografía la relación entre la longitud axial y la predisposición a padecer maculopatía miope, así como la relación entre el espesor coroideo y la longitud axial del globo ocular, hasta donde sabemos, no se había descrito todavía un aumento significativo del factor H asociado a atrofia coroidea profunda y neovascularización.

Si bien con nuestros datos no podemos concluir si este hallazgo es debido a un efecto causa-efecto, una consecuencia o un hallazgo casual, los niveles significativamente elevados del factor H en el grupo de miopía alta ($p < 0.01$) sugieren una posible relación directa entre ambos procesos. En cualquier caso, hasta donde sabemos, somos el primer grupo de investigación que describe alteraciones de la expresión del sistema del complemento relacionadas con el desarrollo y progresión de la miopía alta y el establecimiento de la maculopatía miope, cuyo descubrimiento puede abrir nuevas dianas terapéuticas orientadas al desarrollo de fármacos más eficaces.

1.2 No hay cambios significativos en los niveles del FD del complemento entre miopes y no miopes.

Como hemos mencionado anteriormente, el éxito del sistema del complemento depende del control fino de su funcionamiento. Diferencias sutiles en las concentraciones plasmáticas o en las actividades funcionales de las proteínas reguladoras, tanto inhibitorias (FI y FH) o estimuladoras (FD), podrían tener un impacto significativo en la magnitud de la activación local del complemento en respuesta a un estímulo determinado y, como consecuencia, dar lugar a la liberación local de mediadores proinflamatorios y angiogénicos generando, en última instancia, daño tisular en la retina y el establecimiento de una enfermedad manifiesta.

Partiendo de la premisa de que una activación excesiva del complemento conduce a la liberación de productos de escisión detectables en la circulación, realizamos un análisis de las concentraciones presentes en humor acuoso del factor D del complemento, principal activador de la vía alternativa, en una cohorte de pacientes con miopía alta, baja y control.

El factor D, también conocido como adipsina o CFD es un miembro de las serina proteasas que regula un paso de activación clave en la vía alternativa del complemento. Se expresa fundamentalmente en los macrófagos y en el tejido adiposo, manteniéndose en unas concentraciones plasmáticas muy bajas (1-2 $\mu\text{g/ml}$). En nuestro estudio no hemos encontrado diferencias significativas en la concentración de este factor entre los grupos de miopía alta y baja, así como con los grupos control ($p > 0.05$) (Figura 38b). Además, tampoco hemos encontrado una correlación significativa entre los niveles de expresión del CFD y la longitud axial del globo ocular.

El factor del complemento D es un regulador fundamental de la vía alternativa y actúa en etapas tempranas de la ruta. Es una enzima limitante de la vía y tiene las concentraciones plasmáticas

más bajas de todos los factores del complemento (276). Por estas razones, diversos estudios sobre la DMAE consideraron al CFD como un objetivo terapéutico potencial para el tratamiento de la atrofia geográfica. El lampalizumab, un antifactor D, es un fragmento de unión al antígeno Fab de un anticuerpo monoclonal dirigido contra el CFD e inhibe selectivamente la activación mediada por CFD y la amplificación de la vía alternativa del complemento, pero no afecta el inicio de la vía clásica o de las lectinas (276,277). El ensayo clínico en fase 2 MAHALO muestran que el tratamiento con lampalizumab representa un beneficio potencial en la reducción de la progresión del área de atrofia geográfica. Los resultados también muestran que la modulación del sistema del complemento pueden alterar el curso de la atrofia geográfica, una hipótesis que está respaldada por los estudios genéticos en los que variantes comunes y raras de los genes de la vía alternativa del complemento aumentan la susceptibilidad a sufrir DMAE (204).

Es decir, que la inhibición de la vía alternativa del complemento producía un beneficio potencial en la reducción de la progresión del área atrófica. Esto concuerda con nuestros hallazgos, pues la función principal del FH, cuyos niveles están aumentados en los pacientes con miopía alta, es la de limitar la amplificación de la cascada del complemento y, con ello, limitar los efectos proinflamatorios y proangiogénicos desencadenados por el complemento. Al mismo tiempo, es interesante resaltar que no hemos encontrado alteraciones de expresión del FD significativas, lo cual constituye un aspecto a profundizar en estudios adicionales puesto que el factor D actúa como una enzima esencial para la activación y amplificación de la cascada.

2. La progresión de la miopía alta determina la aparición de cambios estructurales en el segmento posterior del ojo entre los que destaca el adelgazamiento coroideo y la reorganización escleral.

Al igual que sucede con otros órganos, el crecimiento ocular está regulado por mecanismos homeostáticos, siendo la experiencia visual el principal estímulo que regula el crecimiento (94). En la introducción expusimos varios ejemplos de control homeostático del crecimiento: cómo el pez payaso regula su tamaño corporal en función de su estatus social dentro del grupo, el cambio en el tamaño de las vísceras en las serpientes tras una ingesta, etc. En todos estos ejemplos, el control homeostático del crecimiento causa cambios dramáticos en el tamaño de los órganos implicados (103). De igual modo, el ojo responde al desafío notable de enfocar imágenes sobre su retina mediante el ajuste de su longitud axial y las lentes que lo componen. Cuando la imagen generada en la retina es borrosa, la retina reconoce el signo del desenfoque y, en caso de que

la imagen generada se corresponda con la de un ojo miope, responde a tal desenfoque disminuyendo la liberación de dopamina, lo que desencadena un conjunto de sucesos que determinan que el ojo se alargue axialmente, las fibras de colágeno se reorganicen y la coroides se vuelva más delgada (64,117,120,158).

Este conjunto de sucesos explica el adelgazamiento extremo de la coroides encontrado en nuestro estudio en los pacientes con miopía alta en comparación con los pacientes con miopía baja y control (Figura 29) ($p < 0.01$). Además, el análisis de correlación de Spearman entre el espesor coroideo y la longitud axial del globo ocular demostró que ambas variables mantienen una correlación negativa y alta ($R = -0.516$, $p < 0.01$), de manera que las longitudes axiales extremas típicas de la miopía alta determinan grosores coroideos cada vez menores (Figura 30)

La coroides es el manto vascular que proporciona nutrientes y oxígeno a las células de la retina de manera que el adelgazamiento de este tejido compromete el funcionamiento normal de la retina al limitar el acceso de los fotorreceptores al oxígeno. Como consecuencia se generan situaciones de isquemia en la retina (17). La isquemia retiniana genera un desequilibrio celular entre oxidantes y antioxidantes a través de la acumulación de especies reactivas de oxígeno, los cuáles son un importante mecanismo de citotoxicidad. Diferentes estudios *in vitro* han demostrado que la generación de ROS bajo condiciones hipóxico-isquémicas en neuronas se produce bajo tres fuentes principales: a partir de mitocondrias, que generan una explosión inicial de ROS; en respuesta a privación de oxígeno y glucosa, en un segundo evento clave de generación de ROS mediante la activación de la xantina oxidasa (XO); una tercera fuente dependiente de Ca^{2+} , la cual puede ser apreciada tras el periodo de privación de oxígeno y glucosa, probablemente causada por la activación dependiente de calcio de la NADPH oxidasa (278).

3. El estiramiento axial del globo ocular característico de la miopía alta mantiene una estrecha relación con la alteración de la expresión de HGF y factores crecimiento involucrados en el crecimiento ocular.

Para que el ojo con miopía alta pueda continuar su elongación ininterrumpida del eje axial, además del adelgazamiento coroideo progresivo es preciso el debilitamiento estructural de la

esclera (279,280). La esclera está compuesta por una sola capa de tejido conectivo con una población heterogénea de fibroblastos y miofibroblastos. Los fibroblastos secretan colágeno de tipo I, componente principal de las fibras de la esclera. Todos los modelos de miopía desarrollados hasta la fecha muestran una regulación a la baja de la síntesis de colágeno de tipo I junto con un aumento de su degradación en un proceso controlado por las metaloproteinasas y los inhibidores tisulares de la metaloproteinasas (MMPs y TIMPs) y el factor de crecimiento beta transformante (TGF- β) (273,279–281).

El TGF- β es una citocina multifuncional, siendo el TGF- β 2 la forma predominante en los tejidos oculares (282,283). Los estudios recientes desarrollados por Jobling y sus colaboradores muestran que la expresión de TGF- β se reduce en la esclera de los ojos con miopía, mientras que sus niveles en retina permanecen inalterados. Además, los cambios en los niveles de TGF- β son responsables de la reducción de la síntesis de colágeno, lo que sugiere que esta citocina juega un papel central en el control de la estructura escleral durante el desarrollo y progresión de la miopía. Además también desempeña una labor decisiva como potente proangiogénico al estimular la síntesis de VEGF-A por parte del epitelio pigmentario de la retina (153,284). Por su parte, las evidencias sobre las proteinasas involucradas en la regulación de la síntesis y degradación de las fibras de colágeno indican que los niveles de MMPs se incrementan en los ojos con miopía alta, mientras que la expresión de los TIMPs se reducen (285,286).

Sobre estas proteinasas y sobre el factor de crecimiento beta transformante (TGF- β) actúa el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), el cual modula el comportamiento de ambas enzimas sobre las fibras de colágeno esclerales, jugando un papel clave en la remodelación escleral, la elongación axial del globo ocular y el desarrollo de la maculopatía miope (287–291). El factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) es una citocina multifuncional importante para la proliferación celular. Sus receptores se expresan de manera ubicua en el ojo y juegan un papel crítico en muchos procesos fisiológicos y patológicos. Además de su papel regulador de las metaloproteinasas y TGF, HGF también puede inducir la expresión de ZENK (64,113,292), el cual estudios recientes lo asocian con el control del crecimiento ocular (113). Por lo tanto, todas las hipótesis sugieren que HGF puede ser un posible candidato de susceptibilidad para la miopía alta (293).

Nuestros hallazgos demuestran una expresión significativamente elevada de HGF en pacientes con miopía alta respecto a los pacientes con miopía baja y control (Figura 54a). Además, cuando analizamos la relación que dichos niveles de HGF mantenían con la elongación axial del globo ocular, observamos que ambas variables mantenían una correlación estrecha y alta ($R= 0.349$,

$p < 0.001$, $n = 75$) (Figura 36) (281). Así mismo, al estudiar la evolución de las diferentes concentraciones de HGF en función del grado de maculopatía desarrollado por los pacientes del estudio observamos que la concentración de HGF era mayor en aquellos ojos que desarrollaban estafiloma posterior, estrías de laca y neovascularización ($p < 0.01$), lo que sugiere que este factor de crecimiento juega un papel clave en el desarrollo y progresión de la maculopatía miope mediante la regulación de las metaloproteinasas y su acción sobre las fibras de colágeno de la esclera, siendo una potencial diana terapéutica para estas patologías.

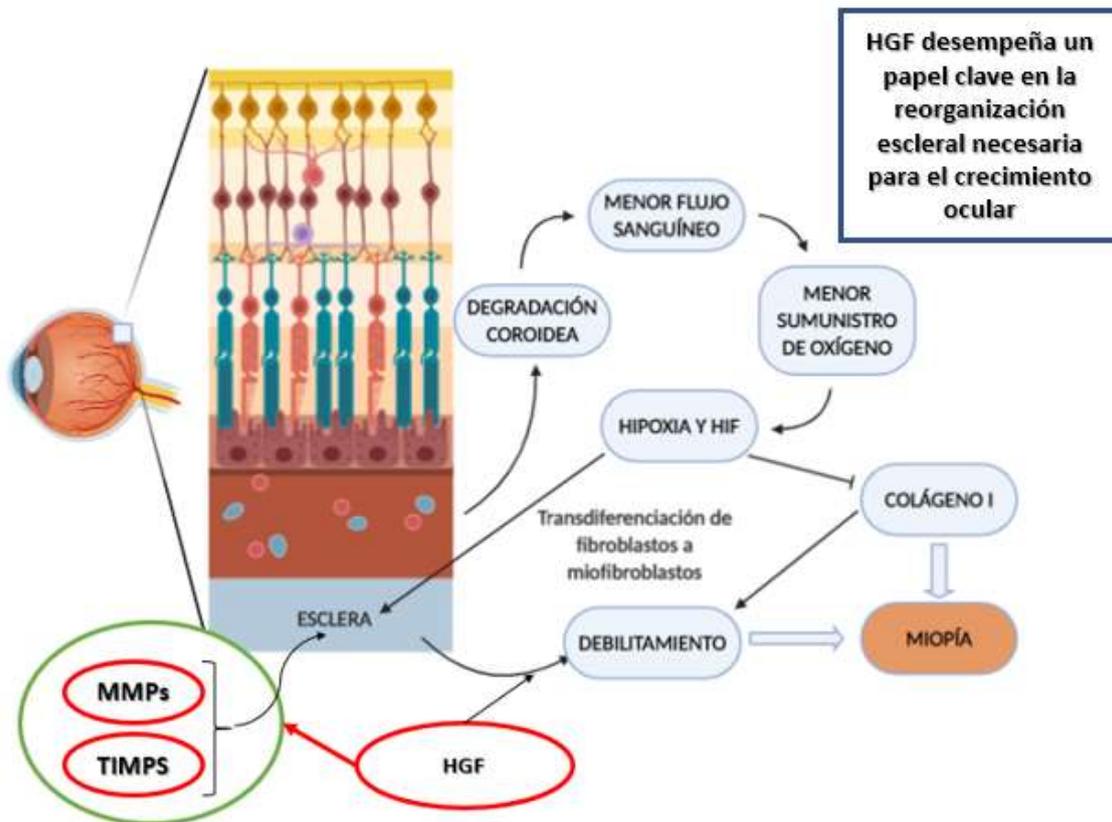


Figura 41: esquema general de los factores de crecimiento y proteinasas involucrados en el reorganización escleral.

En el proceso global de debilitamiento coroidal y escleral participan otras señales moleculares como el ácido retinoico, la acetilcolina, la dopamina retiniana, ZENK, etc. (105,280,294). Sin embargo, a pesar de la importancia de este proceso y de los numerosos modelos realizados hasta la fecha, el conjunto de señales originadas en la retina y que viajan posteriormente hacia la coroides y la esclera para favorecer el debilitamiento estructural de ambos tejidos permanecen todavía desconocidos.

Podemos concluir que el adelgazamiento coroideo profundo y la reorganización de las fibras de colágeno en la esclera constituyen los dos cambios estructurales fundamentales y característicos de la miopía alta. Estos cambios anatómicos condicionan la aparición de un contexto molecular diferente, con situaciones de isquemia y estrés oxidativo/nitrosativo, la desregulación del sistema del complemento con niveles significativamente elevados del FH del complemento, así como incrementos en los factores de crecimiento relacionados con la reorganización estructural de la esclera (HGF y TGF- β). Además, la degeneración coroidea compromete el aporte de oxígeno y nutrientes al tercio avascular de la retina, generando la expresión de factores inducidos por hipoxia como el HIF-1 α y toda la ruta proangiogénica regulada por él.

4. La situación de hipoxia generada como consecuencia del alargamiento posterior del ojo mantiene una estrecha relación con el brote anómalo de nuevos vasos y un mayor riesgo de degeneración macular.

La oxigenación de los tejidos en general y la hipoxia en particular son importantes reguladores de la fisiología retiniana (295). La reducción de la tensión de oxígeno y la expresión de factores de transcripción inducibles por hipoxia, junto con algunos de los genes diana de estos factores, están involucrados de manera crítica en el desarrollo retiniano, especialmente en la generación de una vasculatura normal. La hipoxia es, por tanto, vital para que el ojo en desarrollo establezca la función y visión retiniana adecuadas. Sin embargo, cuando la hipoxia es inadecuada, la baja tensión de oxígeno puede estar asociada al desarrollo de patologías retinianas como la retinopatía del prematuro, retinopatía diabética, glaucoma, degeneración macular asociada a la edad, atrofia retiniana, neovascularización, etc. En los casos patológicos, la baja tensión de oxígeno activa la respuesta inducida por hipoxia que culmina en una mayor expresión de factores de crecimiento proangiogénicos tales como el VEGF, angiopoyetina, EPO, IGF1, PGF, PDGF, SDF, HGF, FGF, CTGF, TGF, TSP-1 (295–297). Por ello, podemos decir que la hipoxia juega un papel dual en la fisiología ocular: por un lado, es necesaria para el establecimiento de la función retiniana, mientras que, por el otro, se encuentra en la base de numerosas patologías vasculares de la retina.

A lo largo de este trabajo hemos demostrado que en los ojos con miopía alta se produce una elongación axial del globo ocular y, como consecuencia de dicha tracción mecánica, un adelgazamiento coroideo profundo. La degeneración coroidea compromete el suministro de

oxígeno y nutrientes a las regiones exteriores de la retina. Ante tal situación, se desencadenan una serie de respuestas homeostáticas destinadas a aumentar la entrega de oxígeno y activar las vías metabólicas alternativas que no requieren de él para la generación de energía (18,298). En estas respuestas están involucrados los productos génicos inducibles por hipoxia tales como el factor inducible por hipoxia HIF-1 α (168). Además, estudios genéticos de secuenciación de ADN han mostrado que el número de genes diana de HIF es superior a 800 y, entre ellos, 45 son genes de susceptibilidad a miopía, lo que sugiere que la cascada iniciada por HIF resulta importante en el desarrollo de la miopía(299–301). Sin embargo hasta la fecha no se había realizado mediciones de estos factores a partir de muestras de humor acuoso y su análisis posterior en función del grado de maculopatía desarrollado por el paciente (173).

Nuestros resultados muestran una reducción significativa en los niveles de expresión de HIF-1 α y de VEGF en aquellos pacientes con miopía alta y, más concretamente, en los casos que padecen atrofia macular, con una correlación positiva y alta en la expresión de ambos parámetros ($p < 0.01$). La familia VEGF está formada por cinco homólogos (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D y VEGF-E). El primer miembro de esta familia es el principal contribuyente de la angiogénesis activando las células endoteliales quiescentes que promueven la permeabilidad vascular a través de su unión a VEGFR-1.

La angiogénesis es un proceso complejo que implica una serie de etapas coordinadas por estímulos diferentes desencadenados como respuesta a los niveles de oxígeno circundantes, los cuáles determinan la expresión de HIF, VEGF, FGF, TGF, angiopoyetina, EPO, IGF1, PGF, PDGF, SDF, HGF, CTGF, TSP-1. Cuando estos estímulos llegan al vaso sanguíneo, las uniones entre las células endoteliales se relajan localmente y permiten que se produzca el brote de nuevas ramificaciones a partir del vaso existente. La célula sometida a mayores niveles de VEGF será seleccionada como célula de punta, dirigiendo el crecimiento del vaso en formación (18). Finalmente, el plexo vascular generado durante la angiogénesis se estabiliza mediante el reclutamiento de PDGF-B, lo cual estimula la proliferación de células del músculo liso e induce la transformación de células murales en mesenquimatosas. Nuestros resultados, por tanto, concuerdan con la hipótesis de que los niveles esperados de VEGF están alterados en el grupo de miopía alta, al mismo tiempo que hay un aumento de la expresión de PDGF-B, pues este factor es necesario para la estabilización de los nuevos vasos en formación durante el proceso de neovascularización típico de la maculopatía miope (147,299,302). Los niveles más bajos de VEGF y otras moléculas vasoactivas como IL-6 pueden deberse también a la dilución por un mayor aumento del volumen intraocular puesto que el análisis de correlación de Spearman

entre ambas moléculas y la longitud axial del globo ocular mostró una correlación negativa y alta ($p < 0.01$).

El tratamiento intravítreo con anti-VEGF (Pegaptanib, Ranibizumab, Bevacizumab y Aflibercept) constituye el tratamiento estándar en las enfermedades de la retina de tipo vascular, como la miopía patológica, la oclusión de la vena retiniana, la DMAE, etc. (136,137,225,303–305). Además, se están realizando investigaciones para dilucidar el papel de PDGF en la angiogénesis retiniana, puesto que la progresión de la maculopatía miope, de acuerdo a nuestros resultados, reduce los niveles de VEGF y aumenta los de PDGF lo que sugiere que la inhibición conjunta de VEGF y PDGF puede suponer una mejora sustancial en los tratamientos actuales ya que muchos de los pacientes tratados con inyecciones anti-VEGF obtienen resultados subóptimos porque el proceso de degeneración vascular está sometido al control de numerosos factores proangiogénicos y no solo de VEGF (138,140,306). De manera similar a PDGF, la inhibición conjunta con IGF-1 puede frenar el desarrollo de nuevos vasos, puesto que es necesaria la presencia de IGF para la activación de VEGF en las células endoteliales (307). Por todo ello y dado que el HIF es el inicio de la ruta inducida por hipoxia, el HIF supone una diana terapéutica potencial pues, además de regular la expresión de VEGF, regula también otros factores de crecimiento vasoactivos involucrados en el proceso tales como el PDGF, SDF-1, angiopoyetina, etc.

HIF1 es un factor heterodimérico, compuesto por dos subunidades (HIF-1 α y HIF-1 β). Bajo condiciones normóxicas, los residuos de prolina de la subunidad HIF-1 α están ubiquitinados y son degradados vía proteasoma, teniendo una vida media muy corta. Sin embargo, bajo condiciones hipóxicas, como sucede en un ojo alto miope, ambas subunidades dimerizan en el interior del núcleo celular y se unen a los elementos de respuesta a hipoxia. Entre los genes diana del heterodímero de HIF-1 destacan: el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), PDGF-B, la transferrina y la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), los transportadores de glucosa GLUT-1 y GLUT-3, así como enzimas relacionadas con el metabolismo anaeróbico y la generación de ATP de manera independiente de oxígeno, la angiogénesis y la inflamación (Figura 13) (164,172,174,278,308). Por todo ello, la reducción de los niveles de HIF reportada en los pacientes de nuestro estudio coincide con los resultados de estudios previos en modelos animales en los que la miopía causó una regulación al alza de HIF en la esclerótica, donde participa de la reorganización de las fibras de colágeno mediante la transdiferenciación de fibroblastos en miofibroblastos (160,309), mientras que es regulado a la baja en la retina y la coroides.

Recientemente se ha probado el empleo de digoxina para el bloqueo de la neovascularización, la cual bloquea la activación transcripcional de HIF-1 y, a su vez, todos los productos génicos regulados por hipoxia (SDF, PDGF, VEGF, etc.) (136,140,309). Así mismo, también se está investigando la aplicación de otros agentes como la doxorrubicina y la daunorubicina, los cuáles actúan como potentes inhibidores de HIF, bloqueando la unión de HIF al ADN y suprimiendo la neovascularización ocular, lo que demuestra la participación directa de HIF en el proceso general (17,299).

Por otro lado, en dos estudios recientes, nuestro grupo ha evidenciado una desregulación del complemento asociada a la progresión de la miopía alta. En este sentido, cabe destacar el papel VEGF desempeña en la regulación de las proteínas del complemento y, en consecuencia, su protección contra el daño potencial y la inflamación aberrante causada por la amplificación de la cascada (302). Las alteraciones degenerativas del EPR y la coroides típicas de la miopía alta pueden conducir al descenso y agotamiento de VEGF incrementando las acciones desencadenadas como consecuencia de la activación inadecuada del complemento.

La introducción de señales inflamatorias extrañas o endógenas en la retina provoca respuestas inmunes innatas. Las células inflamatorias de la retina, la microglía retiniana, reside cerca de los vasos sanguíneos de la retina. Diversos estudios evidencian que la migración subretiniana de la microglía es necesaria para eliminar subproductos visuales y mantener una visión correcta (310). El deterioro de la migración glial promueve la muerte de las células fotorreceptoras. En la DMAE se ha descrito la acumulación en el espacio subretiniano de la microglía, lo cual constituye un síntoma de daño inflamatorio, el cual exacerba la degeneración retiniana. Además, la infiltración de microglía y macrófagos en lugares de lesión retiniana también promueve el crecimiento de lesiones neovasculares (173) ya que los macrófagos, junto con las células del EPR, son una importante fuente de factores proangiogénicos (311). Los macrófagos normalmente no están en la retina, sino que residen en la coroides. En casos de ruptura de la continuidad del EPR migran desde la coroides hacia la retina donde modulan la enfermedad, lo que sugiere que las células inmunes tienen un doble papel en la prevención y promoción de enfermedades en la retina (173). En este sentido, a pesar de que el sistema inmune retiniano es crucial para la homeostasis visual, hemos aportado evidencias de una hiperactivación de procesos inmunes específicos en la patogenia de la miopía alta.

Anteriormente describimos un aumento de la expresión del FH del complemento en los pacientes con miopía alta y, más concretamente, con aquellos que desarrollaron estafiloma posterior, estrías de laca y neovascularización. Estudios recientes han relacionado alteraciones

de este factor en la DMAE asociadas a individuos con un fenotipo “hiperinflamatorio del complemento”, en el que el complemento reacciona de forma exagerada al daño celular y a los desechos en la retina (312–314). Así, además de variantes de CFH se han mostrado hallazgos para otros miembros de la vía alternativa del complemento, incluidos los componentes activadores C3 y el factor B.

La activación inadecuada del complemento conduce, en última instancia, a la activación del inflamosoma (173), que culmina en la expresión de citocinas proinflamatorias. En un estudio reciente se ha identificado un activador poroso del inflamosoma presente en pacientes con atrofia geográfica, con niveles aumentados de IL-18 y NLRP3 en las células del epitelio pigmentario de la retina de estos pacientes (315). En nuestro estudio no hemos encontrado cambios significativos en la expresión de las interleucinas IL-6 e IL-17 ni correlaciones entre estas y la longitud axial del globo ocular. La baja señal encontrada puede deberse a la dificultad de difusión desde la retina hacia la cámara anterior, desde donde extraemos el humor acuoso, por lo que se precisa de comprobaciones adicionales que aporten más luz acerca de la expresión del inflamosoma en pacientes con maculopatía miope.

En cualquier caso, el descubrimiento de alteraciones del sistema del complemento asociados al desarrollo de la maculopatía miope y la estrecha vinculación entre la hipoxia generada como consecuencia del estiramiento axial del ojo abren la posibilidad de nuevas terapias que frenen o impidan el brote anómalo de nuevos vasos en el tercio posterior del globo, permitiendo de este modo el tratamiento de las vasculopatías retinianas que actualmente carecen de él.

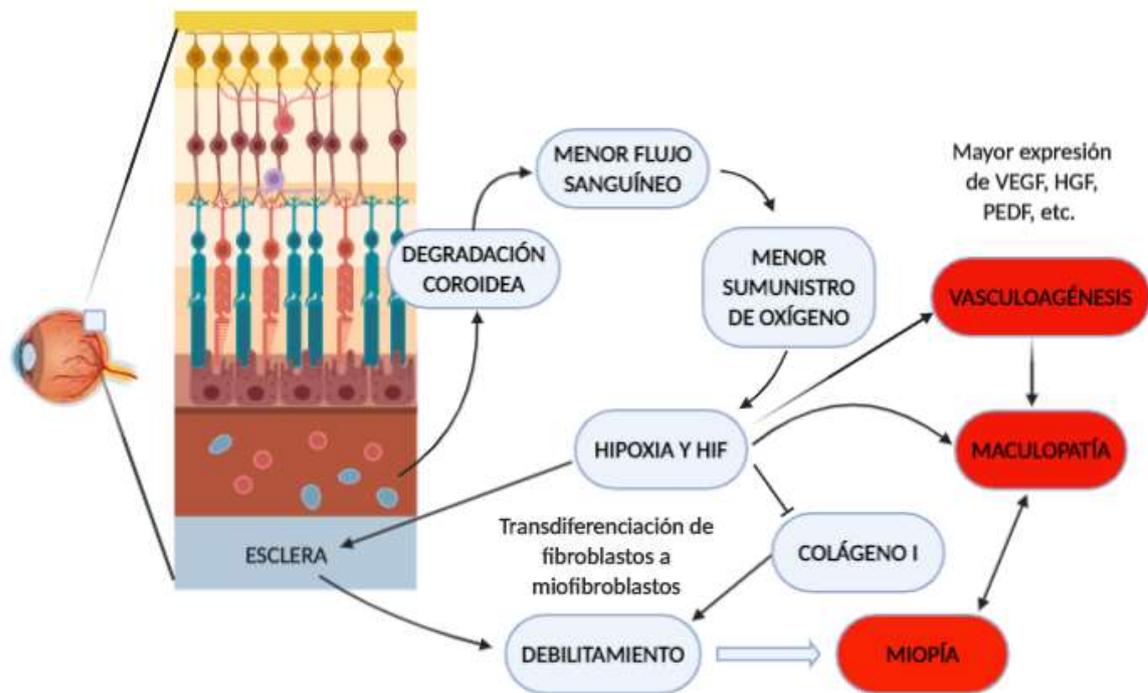


Figura 206: visión integrada del proceso de degeneración retiniana y macular subyacente a la maculopatía miope.

Entre las limitaciones del estudio, que necesitaría comprobaciones adicionales y aumentar el tamaño muestral a fin de maximizar la potencia estadística de los resultados, está también que las determinaciones se han realizado en una población mayor que, además, padece cataratas si bien de un grado homogéneo. Para poder utilizar los marcadores encontrados deberíamos estudiar su presencia en edades anteriores a la aparición de la patología, así como determinar cuándo se producen en la evolución de la enfermedad.

Por otro lado, en nuestro artículo describimos un aumento en los niveles de FH en pacientes con miopía alta respecto a pacientes con miopía baja y control. De manera similar, también describimos un aumento en la concentración de este factor del complemento en aquellos pacientes con estafiloma posterior, estrías de laca y neovascularización frente a aquellos pacientes cuyo ojo tiene un aspecto normal. Sin embargo, la explicación a estos resultados plantea dos posibles escenarios: que el factor H sea un mecanismo de defensa “in extremis” en los que los tejidos oculares productores de FH incrementan su producción para tratar de limitar la acción del complemento y así impedir la amplificación de la cascada y el conjunto de procesos inflamatorios y angiogénicos posteriores. El segundo escenario posible es que la situación de estrés oxidativo/nitrosativo típica de la miopía alta genere un cambio de función en el FH

mediante la nitración de la tirosina en el FH. La forma reducida del CFH tiene un papel protector, mientras que su forma oxidada tiene un papel patológico como activador de la vía alternativa (271). Por lo tanto, es preciso la realización de nuevos estudios que permitan clarificar ambos escenarios y posibiliten una explicación global e integradora del proceso en su conjunto.

En cuanto al estudio de los factores de crecimiento e interleucinas reguladas por hipoxia describimos una estrecha correlación entre los valores de expresión de HIF y VEGF encontrados en humor acuoso de pacientes sometidos a cirugía de cataratas. De manera similar a lo mencionado en el estudio de los factores del complemento, el estudio precisa de comprobaciones adicionales y de un aumento de la población de estudio a fin de maximizar la potencia estadística de los resultados, así como de la realización de un estudio de difusión que permita trasladar las concentraciones medidas en humor acuoso a las concentraciones teóricas esperables en retina y resto de tejidos productores.

CONCLUSIONES.

1. La miopía alta mantiene una estrecha relación con las alteraciones de la vía alternativa del complemento. A medida que progresa la maculopatía miope, se observa un aumento significativo de la expresión del Factor H del complemento, lo que parece mantener una relación causal directa entre ambos procesos.
2. Los cambios estructurales típicos de la miopía alta mantienen una estrecha relación con el incremento de la expresión de HGF en humor acuoso y posiblemente en otros tejidos oculares. El HGF podría participar, además, en el proceso de reorganización escleral característico de la miopía alta, lo que sugiere la importancia central de este factor de crecimiento en la progresión de la maculopatía miope.
3. El estiramiento axial del ojo podrían generar una situación de hipoxia en los tejidos posteriores, alterando la expresión de HIF, el cual regula, a su vez, la cascada proangiogénica posterior. Estos eventos podrían contribuir, en última instancia, el brote anómalo de nuevos vasos y al establecimiento y progresión de la miopía alta.

BIBLIOGRAFÍA

1. Kels BD, Grzybowski A, Grant-Kels JM. Human ocular anatomy. *Clin Dermatol* [Internet]. 2015;33(2):140–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clindermatol.2014.10.006>
2. Baird PN, Saw SM, Lanca C, Guggenheim JA, Smith EL, Zhou X, et al. Myopia. *Nat Rev Dis Prim*. 2020;6(1).
3. Chader GJ, Taylor A. Preface: The aging eye: Normal changes, age-related diseases, and sight-saving approaches. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2013;54(14):2–5.
4. DelMonte DW, Kim T. Anatomy and physiology of the cornea. *J Cataract Refract Surg* [Internet]. 2011;37(3):588–98. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcrs.2010.12.037>
5. King BJ, Burns SA, Sapoznik KA, Luo T, Gast TJ. High-resolution, adaptive optics imaging of the human trabecular meshwork in vivo. *Transl Vis Sci Technol*. 2019;8(5):1–12.
6. Ghiam BK, Xu L, Berry JL. Aqueous humor markers in retinoblastoma, a review. *Transl Vis Sci Technol*. 2019;8(2).
7. Ji Y, Rao J, Rong X, Lou S, Zheng Z, Lu Y. Metabolic characterization of human aqueous humor in relation to high myopia. *Exp Eye Res*. 2017;159:147–55.
8. Zhu X, Zhang K, He W, Yang J, Sun X, Jiang C, et al. Proinflammatory status in the aqueous humor of high myopic cataract eyes. *Exp Eye Res*. 2014;142:13–8.
9. Cammarata PR, Cantu-Crouch D, Oakford L, Morrill A. Macromolecular organization of bovine lens capsule. *Tissue Cell*. 1986;18(1):83–97.
10. Hejtmancik JF, Shiels A. Overview of the Lens. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2015;134:119–27.
11. Maruko I, Iida T. Myopia. *Microperimetry Multimodal Retin Imaging*. 2014;379:129–35.
12. Michael Wormstone I, Wride MA. The ocular lens: A classic model for development, physiology and disease. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. 2011;366(1568):1190–2.
13. Kishi S. Vitreous anatomy and the vitreomacular correlation. *Jpn J Ophthalmol*. 2016;60(4):239–73.
14. De Smet MD, Gad Elkareem AM, Zwinderman AH. The vitreous, the retinal interface in ocular health and disease. *Ophthalmologica*. 2013;230(4):165–78.
15. Bishop P. The biochemical structure of mammalian vitreous. *Eye*. 1996;10(6):664–70.

16. Grossniklaus HE, Green WR. Choroidal neovascularization. *Am J Ophthalmol* [Internet]. 2004 Mar 1 [cited 2018 Dec 19];137(3):496–503. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0002939403011309?via%3Dihub>
17. Campochiaro PA. Molecular pathogenesis of retinal and choroidal vascular diseases. *Progress in Retinal and Eye Research*. 2015.
18. Eelen G, de Zeeuw P, Treps L, Harjes U, Wong BW, Carmeliet P. Endothelial Cell Metabolism. *Physiol Rev*. 2017;98(1):3–58.
19. Wisely CE, Sayed JA, Tamez H, Zelinka C, Abdel-Rahman MH, Fischer AJ, et al. The chick eye in vision research: An excellent model for the study of ocular disease. *Progress in Retinal and Eye Research*. 2017.
20. Murphy CJ, Glasser A, Howland HC. The anatomy of the ciliary region of the chicken eye. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 1995;36(5):889–96.
21. Kaplan HJ. Anatomy and function of the eye. *Chem Immunol Allergy*. 2007;92:4–10.
22. Masland RH. The fundamental plan of the retina. *Nat Neurosci*. 2001;4(9):877–86.
23. Yao X, Son T, Kim TH, Lu Y. Functional optical coherence tomography of retinal photoreceptors. *Exp Biol Med*. 2018;243(17–18):1256–64.
24. Kroeger H, Chiang WC, Felden J, Nguyen A, Lin JH. ER stress and unfolded protein response in ocular health and disease. *FEBS J*. 2019;286(2):399–412.
25. Hoon M, Okawa H, Della Santina L, Wong ROL. Functional architecture of the retina: Development and disease. *Prog Retin Eye Res*. 2014;42(i):44–84.
26. Strauss O. *The Retinal Pigment Epithelium in Visual Function*. 2005; Available from: www.prv.org
27. Boulton M, Dayhaw-barker P. *The role of the retinal*. 2001;
28. Wimmers S, Karl MO, Strauss O. Ion channels in the RPE. *Prog Retin Eye Res*. 2007;26(3):263–301.
29. Schraermeyer U, Heimann K. Current understanding on the role of retinal pigment epithelium and its pigmentation. *Pigment Cell Res*. 1999;12(4):219–36.
30. Young RW, Bok D. Participation of the retinal pigment epithelium in the rod outer segment renewal process. *J Cell Biol*. 1969;

31. Spitznas M, Hogan MJ, Francisco S. Segments of Photoreceptors and the Retinal Pigment Epithelium Outer. 2015;94122.
32. Housset M, Samuel A, Ettaiche M, Bemelmans A, Beby F, Billon N, et al. Loss of Otx2 in the Adult Retina Disrupts Retinal Pigment Epithelium Function, Causing Photoreceptor Degeneration. *J Neurosci*. 2013;
33. Moreno-Marmol T, Cavodeassi F, Bovolenta P. Setting Eyes on the Retinal Pigment Epithelium. *Front Cell Dev Biol*. 2018;
34. Lamb TD, Collin SP, Pugh EN. Evolution of the vertebrate eye: Opsins, photoreceptors, retina and eye cup. *Nat Rev Neurosci*. 2007;8(12):960–76.
35. Lamb TD. Evolution of phototransduction, vertebrate photoreceptors and retina. *Prog Retin Eye Res* [Internet]. 2013;36:52–119. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.preteyeres.2013.06.001>
36. Arendt D. Evolution of eyes and photoreceptor cell types. *Int J Dev Biol*. 2003;47(7–8):563–71.
37. Baker SA, Kerov V. Photoreceptor inner and outer segments [Internet]. 1st ed. Vol. 72, *Current Topics in Membranes*. Elsevier Inc.; 2013. 231–265 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-417027-8.00007-6>
38. Mehri A. Non-extensive distribution of human eye photoreceptors. *J Theor Biol* [Internet]. 2017;419:305–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtbi.2017.02.030>
39. Goldberg AFX, Moritz OL, Williams DS. Molecular basis for photoreceptor outer segment architecture. *Progress in Retinal and Eye Research*. 2016.
40. Anderson DH, Fisher SK, Steinberg RH. Mammalian cones: disc shedding phagocytosis, and renewal. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 1978;17(2):117–33.
41. Debarshi Mustafi¹, Andreas H. Engel^{1, 2} and KP, 1. Structure of Cone Photoreceptors Debarshi. Vol. 6, *Nano*. 2008. 2166–2171 p.
42. Spaide RF, Curcio CA. Anatomic Correlate to the Bands Seen in Outer Retina by Optical Coherence Tomography. *Retina*. 2011;31(8):1609–19.
43. Thoreson, Mangel. Lateral interactions in the vertebrate retina. 2012;31(5):407–41.
44. Sung CH, Chuang JZ. The cell biology of vision. *J Cell Biol*. 2010;190(6):953–63.

45. Diamond JS. Inhibitory Interneurons in the Retina: Types, Circuitry, and Function. *Annu Rev Vis Sci* [Internet]. 2017;3(1):1–24. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-vision-102016-061345>
46. Tsukamoto Y, Omi N. Classification of mouse retinal bipolar cells: Type-specific connectivity with special reference to rod-driven All amacrine pathways. *Front Neuroanat*. 2017;11(October):1–25.
47. Shekhar K, Lapan SW, Whitney IE, Tran NM, Macosko EZ, Kowalczyk M, et al. Comprehensive Classification of Retinal Bipolar Neurons by Single-Cell Transcriptomics. *Cell* [Internet]. 2016;166(5):1308-1323.e30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2016.07.054>
48. Chapot CA, Euler T, Schubert T. How do horizontal cells ‘talk’ to cone photoreceptors? Different levels of complexity at the cone–horizontal cell synapse. *J Physiol*. 2017;595(16):5495–506.
49. Euler T, Haverkamp S, Schubert T, Baden T. Retinal bipolar cells: Elementary building blocks of vision. *Nat Rev Neurosci*. 2014;15(8):507–19.
50. Jackman SL, Babai N, Chambers JJ, Thoreson WB, Kramer RH. A positive feedback synapse from retinal horizontal cells to cone photoreceptors. *PLoS Biol*. 2011;9(5).
51. Lee SCS, Meyer A, Schubert T, Hüser L, Dedek K, Haverkamp S. Morphology and connectivity of the small bistratified A8 amacrine cell in the mouse retina. *J Comp Neurol*. 2015;523(10):1529–47.
52. Ding H, Smith RG, Poleg-Polsky A, Diamond JS, Briggman KL. Species-specific wiring for direction selectivity in the mammalian retina. *Nature* [Internet]. 2016;535(7610):105–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature18609>
53. Yu DY, Cringle SJ, Balaratnasingam C, Morgan WH, Yu PK, Su EN. Retinal ganglion cells: Energetics, compartmentation, axonal transport, cytoskeletons and vulnerability. *Prog Retin Eye Res* [Internet]. 2013;36:217–46. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.preteyeres.2013.07.001>
54. Baden T, Berens P, Franke K, Román Rosón M, Bethge M, Euler T. The functional diversity of retinal ganglion cells in the mouse. *Nature* [Internet]. 2016;529(7586):345–50. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature16468>
55. Diamond JS. Inhibitory Interneurons in the Retina: Types, Circuitry, and Function. *Annu*

- Rev Vis Sci. 2017;3(1):1–24.
56. Provencio I, Rodriguez IR, Jiang G, Hayes WP, Moreira EF, Rollag MD. A novel human opsin in the inner retina. *J Neurosci*. 2000;20(2):600–5.
 57. Lorenzo Lazzerini Ospri¹, Glen Prusky², and Samer Hattar^{1, 3} ¹Department. Mood, the Circadian System, and Melanopsin Retinal Ganglion Cells Lorenzo. 2015;14(11):871–82.
 58. Münch M, Kawasaki A. Intrinsically photosensitive retinal ganglion cells: Classification, function and clinical implications. *Curr Opin Neurol*. 2013;26(1):45–51.
 59. Vecino E, Rodriguez FD, Ruzafa N, Pereiro X, Sharma SC. Glia-neuron interactions in the mammalian retina. *Prog Retin Eye Res [Internet]*. 2016;51:1–40. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.preteyeres.2015.06.003>
 60. Newman E, Reichenbach A. The Muller cell: A functional element of the retina. *Trends Neurosci*. 1996;19(8):307–12.
 61. Bringmann A, Pannicke T, Grosche J, Francke M, Wiedemann P, Skatchkov SN, et al. Müller cells in the healthy and diseased retina. *Prog Retin Eye Res [Internet]*. 2006 Jul 1 [cited 2018 Dec 3];25(4):397–424. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1350946206000164?via%3Dihub>
 62. Bringmann A, Reichenbach A. ROLE OF MÜLLER CELLS IN RETINAL DEGENERATIONS. Vol. 6, *Frontiers in Bioscience*. 2001.
 63. Chen YP, Hocking PM, Wang L, Považay B, Prashar A, To CH, et al. Selective breeding for susceptibility to myopia reveals a gene-environment interaction. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52(7):4003–11.
 64. Morgan IG. The biological basis of myopic refractive error. *Clin Exp Optom*. 2003;86(5):276–88.
 65. Galvis V, Tello A, Camacho PA, Parra MM, Merayo-Llodes J. Bio-environmental factors associated with myopia: An updated review. *Arch la Soc Española Oftalmol (English Ed [Internet]*. 2017 Jul 1 [cited 2018 Nov 16];92(7):307–25. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2173579417300464>
 66. Cai XB, Shen SR, Chen DF, Zhang Q, Jin ZB. An overview of myopia genetics. *Exp Eye Res [Internet]*. 2019;188(May):107778. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.exer.2019.107778>

67. Morgan IG, French AN, Ashby RS, Guo X, Ding X, He M, et al. The epidemics of myopia: Aetiology and prevention. *Prog Retin Eye Res* [Internet]. 2018;62:134–49. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2017.09.004>
68. Wu PC, Huang HM, Yu HJ, Fang PC, Chen CT. Epidemiology of myopia. *Asia-Pacific J Ophthalmol*. 2016;5(6):386–93.
69. Dolgin E. 7543_The myopia boom. *Nature*. 2015;519(7543):276–8.
70. Yuan J, Wu S, Wang Y, Pan S, Wang P, Cheng L. Inflammatory cytokines in highly myopic eyes. *Sci Rep*. 2019;9(1):1–9.
71. Liang CL, Hsu PY, Ngo CS, Seow WJ, Karnani N, Pan H, et al. HOXA9 is a novel myopia risk gene. *BMC Ophthalmol*. 2019;19(1):1–8.
72. Grzybowski A, Kanclerz P, Tsubota K, Lanca C, Saw SM. A review on the epidemiology of myopia in school children worldwide. *BMC Ophthalmol*. 2020;20(1):27.
73. Torii H, Kurihara T, Seko Y, Negishi K, Ohnuma K, Inaba T, et al. Violet Light Exposure Can Be a Preventive Strategy Against Myopia Progression. *EBioMedicine* [Internet]. 2017 Feb 1 [cited 2018 Oct 17];15:210–9. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352396416305862>
74. Mehta N, Wen A. Myopia: A global epidemic. *Retin Today*. 2019;2019(September):52–5.
75. Rose KA, French AN, Morgan IG. Environmental factors and myopia: Paradoxes and prospects for prevention. Vol. 5, *Asia-Pacific Journal of Ophthalmology*. Asia-Pacific Academy of Ophthalmology; 2016. p. 403–10.
76. Lopes MC, Andrew T, Carbonaro F, Spector TD, Hammond CJ. Estimating heritability and shared environmental effects for refractive error in twin and family studies. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2009;50(1):126–31.
77. Dirani M, Chamberlain M, Shekar SN, Islam AFM, Garoufalis P, Chen CY, et al. Heritability of refractive error and ocular biometrics: The genes in myopia (GEM) twin study. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47(11):4756–61.
78. Lyhne N, Sjølie AK, Kyvik KO, Green A. The importance of genes and environment for ocular refraction and its determiners: A population based study among 20-45 year old twins. *Br J Ophthalmol*. 2001;85(12):1470–6.
79. Yang X, Liu X, Peng J, Zheng H, Lu F, Gong B, et al. Evaluation of MYOC, ACAN, HGF, and

- MET as candidate genes for high myopia in a Han Chinese population. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2014;18(6):446–52.
80. Schippert R, Schaeffel F, Feldkaemper MP. Microarray analysis of retinal gene expression in *Egr-1* knockout mice. *Mol Vis*. 2009;15(August):2720–39.
 81. Brand C, Schaeffel F, Feldkaemper MP. A microarray analysis of retinal transcripts that are controlled by image contrast in mice. *Mol Vis*. 2007;13(June):920–32.
 82. McGlinn AM, Baldwin DA, Tobias JW, Budak MT, Khurana TS, Stone RA. Form-deprivation myopia in chick induces limited changes in retinal gene expression. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2007;48(8):3430–6.
 83. Jr JTS, Norton TT. during Induced Myopia and Recovery. 2007;43(7):2067–75.
 84. Chakraborty R, Ostrin LA, Nickla DL, Iuvone PM, Pardue MT, Stone RA. Circadian rhythms, refractive development, and myopia. *Ophthalmic Physiol Opt*. 2018 May 1;38(3):217–45.
 85. Tkatchenko A V., Tkatchenko T V., Guggenheim JA, Verhoeven VJM, Hysi PG, Wojciechowski R, et al. *APLP2* Regulates Refractive Error and Myopia Development in Mice and Humans. *PLoS Genet*. 2015;11(8):1–25.
 86. Curtin BJ. Physiologic vs Pathologic Myopia: Genetics vs Environment. *Ophthalmology* [Internet]. 1979;86(5):681–91. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0161-6420\(79\)35466-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0161-6420(79)35466-5)
 87. Flitcroft DI. The complex interactions of retinal, optical and environmental factors in myopia aetiology. *Prog Retin Eye Res* [Internet]. 2012;31(6):622–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.preteyeres.2012.06.004>
 88. Eppenberger LS, Sturm V. The role of time exposed to outdoor light for myopia prevalence and progression: A literature review [Internet]. Vol. 14, *Clinical Ophthalmology*. Dove Medical Press Ltd; 2020 [cited 2021 Mar 13]. p. 1875–90. Available from: </pmc/articles/PMC7337435/>
 89. Tkatchenko T V., Shah RL, Nagasaki T, Tkatchenko A V. Analysis of genetic networks regulating refractive eye development in collaborative cross progenitor strain mice reveals new genes and pathways underlying human myopia. *BMC Med Genomics*. 2019;12(1):1–24.
 90. Pan CW, Wu RK, Li J, Zhong H. Low prevalence of myopia among school children in rural

- China. *BMC Ophthalmol.* 2018;18(1):1–6.
91. Troilo D, Li T, Glasser A, Howland HC. Differences in eye growth and the response to visual deprivation in different strains of chicken. *Vision Res.* 1995;35(9):1211–6.
 92. Troilo D, Gottlieb MD, Wallman J. Visual deprivation causes myopia in chicks with optic nerve section. *Curr Eye Res.* 1987;6(8):993–9.
 93. Liao X, Yap MKH, Leung KH, Kao PYP, Liu LQ, Yip SP. Genetic Association Study of KCNQ5 Polymorphisms with High Myopia. *Biomed Res Int.* 2017;2017.
 94. Smith EL, Hung LF, Arumugam B. Visual regulation of refractive development: Insights from animal studies. *Eye.* 2014;28(2):180–8.
 95. Ohno-Matsui K. Pathologic myopia. *Asia-Pacific Journal of Ophthalmology.* 2016.
 96. Ng DSC, Cheung CYL, Luk FO, Mohamed S, Brelen ME, Yam JCS, et al. Advances of optical coherence tomography in myopia and pathologic myopia. Vol. 30, *Eye (Basingstoke)*. Nature Publishing Group; 2016. p. 901–16.
 97. Agarwal A, Invernizzi A, Singh RB, Foulsham W, Aggarwal K, Handa S, et al. An update on inflammatory choroidal neovascularization: epidemiology, multimodal imaging, and management. *Journal of Ophthalmic Inflammation and Infection.* 2018.
 98. Viola F, Dell’Arti L, Benatti E, Invernizzi A, Mapelli C, Ferrari F, et al. Choroidal Findings in Dome-Shaped Macula in Highly Myopic Eyes: A Longitudinal Study. *Am J Ophthalmol* [Internet]. 2015 Jan 1 [cited 2018 Dec 11];159(1):44–52. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0002939414006163>
 99. Borrelli E, Sarraf D, Freund KB, Sadda SR. OCT angiography and evaluation of the choroid and choroidal vascular disorders. Vol. 67, *Progress in Retinal and Eye Research*. Elsevier Ltd; 2018. p. 30–55.
 100. Morgan IG, French AN, Ashby RS, Guo X, Ding X, He M, et al. The epidemics of myopia: Aetiology and prevention. *Prog Retin Eye Res* [Internet]. 2018 Jan 1 [cited 2018 Oct 17];62:134–49. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1350946217300393>
 101. Vongphanit J, Mitchell P, Wang JJ. Prevalence and progression of myopic retinopathy in an older population. *Ophthalmology* [Internet]. 2002 Apr 1 [cited 2018 Dec 11];109(4):704–11. Available from:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0161642001010247?via%3Dihub>

102. Hosoda Y, Yoshikawa M, Miyake M, Tabara Y, Shimada N, Zhao W, et al. CCDC102B confers risk of low vision and blindness in high myopia. *Nat Commun*. 2018;9(1):1–7.
103. Wallman J, Winawer J. Homeostasis of eye growth and the question of myopia. *Neuron*. 2004;43(4):447–68.
104. Chakraborty R, Ostrin LA, Nickla DL, Iuvone PM, Pardue MT, Stone RA. Circadian rhythms, refractive development, and myopia. *Ophthalmic Physiol Opt*. 2018;38(3):217–45.
105. Wildsoet C, Wallman J. Choroidal and scleral mechanisms of compensation for spectacle lenses in chicks. *Vision Res*. 1995;
106. Schaeffel F, Feldkaemper M. Animal models in myopia research. *Clinical and Experimental Optometry*. 2015.
107. Rucker FJ, Wallman J. Chick eyes compensate for chromatic simulations of hyperopic and myopic defocus: Evidence that the eye uses longitudinal chromatic aberration to guide eye-growth. *Vision Res [Internet]*. 2009 Jul 1 [cited 2018 Oct 17];49(14):1775–83. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004269890900159X#fig6>
108. Zhang Y, Wildsoet CF. RPE and Choroid Mechanisms Underlying Ocular Growth and Myopia. In: *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. Elsevier B.V.; 2015. p. 221–40.
109. Rymer J, Wildsoet CF. The role of the retinal pigment epithelium in eye growth regulation and myopia: A review [Internet]. Vol. 22, *Visual Neuroscience*. *Vis Neurosci*; 2005 [cited 2021 Mar 13]. p. 251–61. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16079001/>
110. Djamgoz MBA, Wagner HJ. Localization and function of dopamine in the adult vertebrate retina. *Neurochem Int*. 1992;20(2):139–91.
111. Cohen Y, Peleg E, Belkin M, Polat U, Solomon AS. Ambient illuminance, retinal dopamine release and refractive development in chicks. *Exp Eye Res*. 2012 Oct;103:33–40.
112. Zhou X, Pardue MT, Iuvone PM, Qu J. Dopamine signaling and myopia development: What are the key challenges. *Prog Retin Eye Res [Internet]*. 2017 Nov 1 [cited 2019 May 28];61:60–71. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1350946217300101>

113. Feldkaemper M, Schaeffel F. An updated view on the role of dopamine in myopia. *Exp Eye Res.* 2013 Sep;114:106–19.
114. Stone RA, Lin T, Laties AM, Iuvone PM. Retinal dopamine and form-deprivation myopia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86(2):704–6.
115. Stone RA, Pendrak K, Sugimoto R, Lin T, Gill AS, Capehart C, et al. Local patterns of image degradation differentially affect refraction and eye shape in chick. *Curr Eye Res.* 2006 Jan 1;31(1):91–105.
116. Pendrak K, Nguyen T, Lin T, Capehart C, Zhu X, Stone RA. Retinal dopamine in the recovery from experimental myopia. *Curr Eye Res.* 1997;16(2):152–7.
117. Huang F, Huang F, Yan T, Yan T, Shi F, Shi F, et al. Activation of dopamine d2 receptor is critical for the development of form-deprivation myopia in the c57bl/6 mouse. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2014;55(9):5537–44.
118. Qiao SN, Zhang Z, Ribelayga CP, Zhong YM, Zhang DQ. Multiple cone pathways are involved in photic regulation of retinal dopamine. *Sci Rep.* 2016;6:1–13.
119. Feldkaemper M, Schaeffel F. An updated view on the role of dopamine in myopia. *Exp Eye Res.* 2013 Sep;114:106–19.
120. Ashby R, Kozulin P, Megaw PL, Morgan IG. Alterations in ZENK and glucagon RNA transcript expression during increased ocular growth in chickens. *Mol Vis.* 2010;16(April):639–49.
121. Ashby R, McCarthy CS, Maleszka R, Megaw P, Morgan IG. A muscarinic cholinergic antagonist and a dopamine agonist rapidly increase ZENK mRNA expression in the form-deprived chicken retina. *Exp Eye Res.* 2007 Jul;85(1):15–22.
122. Martinez-Lozada Z, Guillem AM, Robinson MB. Transcriptional Regulation of Glutamate Transporters. From Extracellular Signals to Transcription Factors. In: *Advances in Pharmacology.* Academic Press Inc.; 2016. p. 103–45.
123. Aamodt SM, Shi J, Colonnese MT, Veras W, Constantine-Paton M. Chronic NMDA exposure accelerates development of GABAergic inhibition in the superior colliculus. *J Neurophysiol.* 2000;83(3):1580–91.
124. Stone RA, Liu J, Sugimoto R, Capehart C, Zhu X, Pendrak K. GABA, experimental myopia, and ocular growth in chick. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44(9):3933–46.

125. Bormann J. The “ABC” of GABA receptors [Internet]. Vol. 21, Trends in Pharmacological Sciences. Elsevier Ltd; 2000 [cited 2020 Jul 15]. p. 16–9. Available from: <http://www.cell.com/article/S0165614799014133/fulltext>
126. Guoping L, Xiang Y, Jianfeng W, Dadong G, Jie H, Wenjun J, et al. Alterations of glutamate and γ -aminobutyric acid expressions in normal and myopic eye development in Guinea pigs. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2017;58(2):1256–65.
127. Sagdullaev BT, Eggers ED, Purgert R, Lukasiewicz PD. Nonlinear interactions between excitatory and inhibitory. *J Neurosci*. 2011;31(42):15102–12.
128. Zhang H, Wong CL, Shan SW, Li KK, Cheng AK, Lee KL, et al. Characterisation of Cl⁻ transporter and channels in experimentally induced myopic chick eyes. *Clin Exp Optom*. 2011;94(6):528–35.
129. Mao J, Liu S. Regulation of RPE barrier function by all-trans retinoic acid in myopia. *Neurosci Lett*. 2014 May 7;568:17–22.
130. Sene A, Chin-Yee D, Apte RS. Seeing through VEGF: Innate and adaptive immunity in pathological angiogenesis in the eye. *Trends Mol Med*. 2015;21(1):43–51.
131. Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. Vol. 473, *Nature*. Nature; 2011. p. 298–307.
132. Deissler HL, Deissler H, Lang GK, Lang GE. VEGF but not PlGF disturbs the barrier of retinal endothelial cells. *Exp Eye Res* [Internet]. 2013 Oct 1 [cited 2018 Dec 3];115:162–71. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014483513002169?via%3Dihub>
133. Van Bergen T, Etienne I, Cunningham F, Moons L, Schlingemann RO, Feyen JHM, et al. The role of placental growth factor (PlGF) and its receptor system in retinal vascular diseases. Vol. 69, *Progress in Retinal and Eye Research*. Elsevier Ltd; 2019. p. 116–36.
134. Sarwar S, Maya JR, Hanout M, Sepah YJ, Do D V., Nguyen QD. Aflibercept for neovascular age-related macular degeneration. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014;
135. Mathis U, Ziemssen F, Schaeffel F. Effects of a human VEGF antibody (Bevacizumab) on deprivation myopia and choroidal thickness in the chicken. *Exp Eye Res* [Internet]. 2014 Oct 1 [cited 2018 Oct 17];127:161–9. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014483514002115?via%3Dihub>

136. Ba J, Peng RS, Xu D, Li YH, Shi H, Wang Q, et al. Intravitreal anti-VEGF injections for treating wet age-related macular degeneration: A systematic review and meta-analysis. *Drug Design, Development and Therapy*. 2015.
137. Evans J, Virgili G. Anti-VEGF drugs: Evidence for effectiveness. *Community Eye Health Journal*. 2014.
138. Abramsson A, Lindblom P, Betsholtz C. Endothelial and nonendothelial sources of PDGF-B regulate pericyte recruitment and influence vascular pattern formation in tumors. *J Clin Invest*. 2003;112(8):1142–51.
139. Gaengel K, Genové G, Armulik A, Betsholtz C. Endothelial-mural cell signaling in vascular development and angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29(5):630–8.
140. Hellström M, Kalén M, Lindahl P, Abramsson A, Betsholtz C. Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. *Development [Internet]*. 1999;126(14):3047–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10375497>
141. Long Q, Cao X, Bian A, Li Y. C3a Increases VEGF and Decreases PEDF mRNA Levels in Human Retinal Pigment Epithelial Cells. *Biomed Res Int*. 2016;2016.
142. Chen W, Guan Y, He G, Li Z, Song H, Xie S, et al. Aqueous Levels of Pigment Epithelium-Derived Factor and Macular Choroidal Thickness in High Myopia. *J Ophthalmol*. 2015;2015.
143. Lange J, Yafai Y, Reichenbach A, Wiedemann P, Eichler W. Regulation of pigment epithelium-derived factor production and release by retinal glial (Müller) cells under hypoxia. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2008;49(11):5161–7.
144. Minkevich NI, Morozova-Roche LA, Iomdina EN, Rakitina T V., Bogachuk AP, Kakuev DL, et al. Abnormal pigment epithelium-derived factor processing in progressive myopia. *Exp Eye Res [Internet]*. 2016;152:1–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.exer.2016.08.017>
145. Pournaras CJ, Rungger-Brändle E, Riva CE, Hardarson SH, Stefansson E. Regulation of retinal blood flow in health and disease. *Prog Retin Eye Res [Internet]*. 2008 May 1 [cited 2018 Dec 3];27(3):284–330. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S135094620800013X?via%3Dihub>
146. Oku H, Kodama T, Sakagami K, Puro DG. Diabetes-induced disruption of gap junction

- pathways within the retinal microvasculature. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2001;
147. Mesquita J, Castro-de-Sousa JP, Vaz-Pereira S, Neves A, Passarinha LA, Tomaz CT. Vascular endothelial growth factors and placenta growth factor in retinal vasculopathies: Current research and future perspectives. *Cytokine Growth Factor Rev* [Internet]. 2018 Feb 1 [cited 2018 Nov 15];39:102–15. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359610117301697?via%3Dihub#fig0005>
 148. Beenken A, Mohammadi M. The FGF family: Biology, pathophysiology and therapy. Vol. 8, *Nature Reviews Drug Discovery*. *Nat Rev Drug Discov*; 2009. p. 235–53.
 149. Gentle A, McBrien NA. Retinoscleral control of scleral remodelling in refractive development: A role for endogenous FGF-2? *Cytokine*. 2002;18(6):344–8.
 150. Uriel S, Brey EM, Greisler HP. Sustained low levels of fibroblast growth factor-1 promote persistent microvascular network formation. *Am J Surg*. 2006;192(5 SPEC. ISS.):604–9.
 151. Tosi GM, Caldi E, Neri G, Nuti E, Marigliani D, Baiocchi S, et al. HTRA1 and TGF- β 1 concentrations in the aqueous humor of patients with neovascular age-related macular degeneration. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2017;
 152. Chen BY, Wang CY, Chen WY, Ma JX. Altered TGF- β 2 and bFGF expression in scleral desmocytes from an experimentally-induced myopia guinea pig model. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2013;251(4):1133–44.
 153. Zhang K, Zhu X, Chen M, Sun X, Yang J, Zhou P, et al. Elevated Transforming Growth Factor- β 2 in the Aqueous Humor: A Possible Explanation for High Rate of Capsular Contraction Syndrome in High Myopia. *J Ophthalmol*. 2016;2016.
 154. Zhang H, Liu Z-L. Transforming growth factor- β neutralizing antibodies inhibit subretinal fibrosis in a mouse model. *Int J Ophthalmol* [Internet]. 2012;5(3):307–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22773978>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3388398>
 155. Hackett SF, Ozaki H, Strauss RW, Wahlin K, Suri C, Maisonpierre P, et al. Angiopoietin 2 expression in the retina: Upregulation during physiologic and pathologic neovascularization. *J Cell Physiol*. 2000;184(3):275–84.
 156. Wojciechowski R. Nature and nurture: The complex genetics of myopia and refractive error. Vol. 79, *Clinical Genetics*. NIH Public Access; 2011. p. 301–20.

157. Rada JA, Thoft RA, Hassell JR. Increased aggrecan (cartilage proteoglycan) production in the sclera of myopic chicks. *Dev Biol.* 1991;147(2):303–12.
158. Summers Rada JA, Shelton S, Norton TT. The sclera and myopia. *Exp Eye Res* [Internet]. 2006 Feb 1 [cited 2018 Dec 19];82(2):185–200. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014483505002514?via%3Dihub>
159. McBrien NA. Regulation of scleral metabolism in myopia and the role of transforming growth factor-beta. *Exp Eye Res* [Internet]. 2013;114:128–40. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.exer.2013.01.014>
160. Wu H, Chen W, Zhao F, Zhou Q, Reinach PS, Deng L, et al. Scleral hypoxia is a target for myopia control. *Proc Natl Acad Sci.* 2018;
161. Wu H, Chen W, Zhao F, Zhou Q, Reinach PS, Deng L, et al. Scleral hypoxia is a target for myopia control. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2018 Jul 24 [cited 2018 Dec 19];115(30):E7091–100. Available from: <https://www.pnas.org/content/115/30/E7091>
162. Kur J, Newman EA, Chan-Ling T. Cellular and physiological mechanisms underlying blood flow regulation in the retina and choroid in health and disease. *Progress in Retinal and Eye Research.* 2012.
163. Alder VA, Ben-Nun J, Cringle SJ. PO₂ profiles and oxygen consumption in cat retina with an occluded retinal circulation. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 1990;31(6):1029–34.
164. Wang GL, Jiang B-H, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension (dioxin receptor/erythropoietin/hypoxia/transcription). *Genetics* [Internet]. 1995;92(June):5510–4. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC41725/pdf/pnas01488-0269.pdf>
165. li ling, Yu J, Jiao shuhong, Wang W, Zhang F, sun shiqing. OncoTargets and Therapy Dovepress Vandetanib (ZD6474) induces antiangiogenesis through mTOR-hiF-1 alpha-VegF signaling axis in breast cancer cells. *Onco Targets Ther* [Internet]. 2018;11–8543. Available from: <http://dx.doi.org/10.2147/OTT.S175578>
166. Masoud GN, Li W. HIF-1 α pathway: Role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharmaceutica Sinica B.* 2015.
167. Semenza GL. Targets for cancer therapy. *Trends Pharmacol Sci.* 2012;33(4):207–14.

168. Maltepe E, Simon MC. Oxygen, genes, and development: An analysis of the role of hypoxic gene regulation during murine vascular development. Vol. 76, *Journal of Molecular Medicine*. J Mol Med (Berl); 1998. p. 391–401.
169. Simon MC, Ramirez-Bergeron D, Mack F, Hu CJ, Pan Y, Mansfield K. Hypoxia, HIFs, and cardiovascular development. In: *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2002. p. 127–32.
170. Lange CAK, Luhmann UFO, Mowat FM, Georgiadis A, West EL, Abrahams S, et al. Von Hippel-Lindau protein in the RPE is essential for normal ocular growth and vascular development. *Dev*. 2012;139(13):2340–50.
171. Keith B, Simon MC. The role of oxygen availability in embryonic development and stem cell function. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2008;9(4):285+. Available from: <http://go.galegroup.com/ps/i.do?id=GALE%7CA179278789&v=2.1&u=ureginalib&it=r&p=HRCA&sw=w>
172. Kurihara T, Westenskow PD, Friedlander M. Hypoxia-inducible factor (HIF)/vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in the retina. *Advances in experimental medicine and biology*. 2014.
173. Ambati J, Atkinson JP, Gelfand BD. Immunology of age-related macular degeneration. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(6):438–51.
174. Bruegge K, Jelkmann W, Metzen E. Hydroxylation of hypoxia-inducible transcription factors and chemical compounds targeting the HIF- α hydroxylases. *Curr Med Chem*. 2007;14(17):1853–62.
175. Bruick RK, McKnight SL. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science* (80-). 2001;294(5545):1337–40.
176. Yamashita K, Discher DJ, Hu J, Bishopric NH, Webster KA. Molecular regulation of the endothelin-1 gene by hypoxia. Contributions of hypoxia-inducible factor-1, activator protein-1, GATA-2, and p300/CBP. *J Biol Chem*. 2001;276(16):12645–53.
177. Salceda S, Caro J. Hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J Biol Chem*. 1997;272(36):22642–7.
178. Epstein ACR, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole DR, et al. *C. elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by

- prolyl hydroxylation. *Cell*. 2001;107(1):43–54.
179. Semenza GL. Oxygen homeostasis. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* [Internet]. 2010 May 9 [cited 2020 Mar 19];2(3):336–61. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/wsbm.69>
 180. Schödel J, Oikonomopoulos S, Ragoussis J, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Mole DR. High-resolution genome-wide mapping of HIF-binding sites by CHIP-seq. *Blood*. 2011;117(23):207–17.
 181. Xia X, Kung AL. Preferential binding of HIF-1 to transcriptionally active loci determines cell-type specific response to hypoxia. *Genome Biol*. 2009;10(10):1–12.
 182. Baird A, Esch F, Guillemin R, Gospodarowicz D. Retina- and Eye-Derived Endothelial Cell Growth Factors: Partial Molecular Characterization and Identity with Acidic and Basic Fibroblast Growth Factors. *Biochemistry*. 1985 Dec 1;24(27):7855–60.
 183. Medici D, Olsen BR. Rapamycin inhibits proliferation of hemangioma endothelial cells by reducing HIF-1-dependent expression of VEGF. *PLoS One*. 2012;
 184. Chen W, Song H, Xie S, Han Q, Tang X, Chu Y. Correlation of macular choroidal thickness with concentrations of aqueous vascular endothelial growth factor in high myopia. *Curr Eye Res*. 2015;40(3):307–13.
 185. Ikuno Y, Ohno-Matsui K, Wong TY, Korobelnik J-F, Vitti R, Li T, et al. Intravitreal Aflibercept Injection in Patients with Myopic Choroidal Neovascularization: The MYRROR Study. *Ophthalmology* [Internet]. 2015 Jun 1 [cited 2018 Oct 31];122(6):1220–7. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0161642015000986?via%3Dihub>
 186. Wu H, Chen W, Zhao F, Zhou Q, Reinach PS, Deng L, et al. Scleral hypoxia is a target for myopia control. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2018 Jul 24 [cited 2018 Oct 15];115(30):E7091–100. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29987045>
 187. Walport MJ. Advances in immunology: Complement (first of two parts). Vol. 344, *New England Journal of Medicine*. N Engl J Med; 2001. p. 1058–66.
 188. Wagner E, Frank MM. Therapeutic potential of complement modulation. Vol. 9, *Nature Reviews Drug Discovery*. Nature Publishing Group; 2010. p. 43–56.
 189. Maugeri A, Barchitta M, Mazzone MG, Giuliano F, Agodi A. Complement system and age-

- related macular degeneration: Implications of gene-environment interaction for preventive and personalized medicine. *Biomed Res Int*. 2018;2018.
190. Wu J, Sun X. Complement system and age-related macular degeneration: Drugs and challenges. *Drug Des Devel Ther*. 2019;13:2413–25.
 191. Kijlstra A, Berendschot TTJM. Age-Related Macular Degeneration: A Complementopathy? *Ophthalmic Res*. 2015;54(2):64–73.
 192. Sarma JV, Ward P a. The Compliment System. *NIH Public Access author Manuscr*. 2012;343(343(1)):227–35.
 193. Bajic G, Degn SE, Thiel S, Andersen GR. Complement activation, regulation, and molecular basis for complement-related diseases. *EMBO J*. 2015;34(22):2735–57.
 194. Merle NS, Church SE, Fremeaux-Bacchi V, Roumenina LT. Complement system part I - molecular mechanisms of activation and regulation. *Front Immunol*. 2015;6(JUN):1–30.
 195. Bottazzi B, Doni A, Garlanda C, Mantovani A. An Integrated View of Humoral Innate Immunity: Pentraxins as a Paradigm. *Annu Rev Immunol*. 2010;28(1):157–83.
 196. Matsushita M. The complement system of agnathans. *Front Immunol*. 2018;9(JUN):1–6.
 197. Harboe M, Ulvund G, Vien L, Fung M, Mollnes TE. The quantitative role of alternative pathway amplification in classical pathway induced terminal complement activation. *Clin Exp Immunol*. 2004;138(3):439–46.
 198. Mandal MNA, Ayyagari R. Complement factor H: Spatial and temporal expression and localization in the eye. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47(9):4091–7.
 199. Rodríguez De Córdoba S, Esparza-Gordillo J, Goicoechea De Jorge E, Lopez-Trascasa M, Sánchez-Corral P. The human complement factor H: Functional roles, genetic variations and disease associations. *Mol Immunol*. 2004;41(4):355–67.
 200. Morgan BP, Gasque P. Extrahepatic complement biosynthesis: Where, when and why? *Clin Exp Immunol*. 1997;107(1):1–7.
 201. Weiler JM, Daha MR, Austen KF, Fearon DT. Control of the amplification convertase of complement by the plasma protein β 1H. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1976;73(9):3268–72.
 202. Muller-eberhard HJ, Jolla L. Function of the Complement System. *Annu Rev Biochem*. 1988;57:321–47.

203. Sánchez-Corral P, Pouw RB, López-Trascasa M, Józsi M. Self-damage caused by dysregulation of the complement alternative pathway: Relevance of the factor H protein family. *Front Immunol*. 2018;9(JUL):1–19.
204. Hageman GS, Anderson DH, Johnson L V, Hancox LS, Taiber AJ, Hardisty LI, et al. A common haplotype in the complement regulatory gene factor H (HF1CFH) predisposes individuals to age-related macular degeneration [Internet]. 2005. Available from: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0501536102
205. Landowski M, Kelly U, Klingeborn M, Groelle M, Ding JD, Grigsby D, et al. Human complement factor H Y402H polymorphism causes an age-related macular degeneration phenotype and lipoprotein dysregulation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019 Feb 26;116(9):3703–11.
206. Stanton CM, Yates JRW, den Hollander AI, Seddon JM, Swaroop A, Stambolian D, et al. Complement factor D in age-related macular degeneration. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52(12):8828–34.
207. Tian Y, Kijlstra A, Webers CAB, Berendschot TTJM. Lutein and Factor D: Two intriguing players in the field of age-related macular degeneration. *Arch Biochem Biophys* [Internet]. 2015;572:49–53. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2015.01.019>
208. Lorthiois E, Anderson K, Vulpetti A, Rogel O, Cumin F, Ostermann N, et al. Discovery of Highly Potent and Selective Small-Molecule Reversible Factor D Inhibitors Demonstrating Alternative Complement Pathway Inhibition in Vivo. *J Med Chem*. 2017;60(13):5717–35.
209. McHarg S, Clark SJ, Day AJ, Bishop PN. Age-related macular degeneration and the role of the complement system. Vol. 67, *Molecular Immunology*. Elsevier Ltd; 2015. p. 43–50.
210. Edwards AO, Ritter R, Abel KJ, Manning A, Panhuysen C, Farrer LA. Complement Factor H Polymorphism and Age-Related Macular Degeneration. *Science* (80-) [Internet]. 2005 Apr 15 [cited 2018 Dec 19];308(5720):421–4. Available from: <http://science.sciencemag.org/content/308/5720/421>
211. Dobó J, Kocsis A, Gál P. Be on target: Strategies of targeting alternative and lectin pathway components in complement-mediated diseases. *Front Immunol*. 2018;9(AUG).
212. Harris CL, Pouw RB, Kavanagh D, Sun R, Ricklin D. Developments in anti-complement therapy; from disease to clinical trial. *Mol Immunol* [Internet]. 2018;102(June):89–119.

Available from: <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2018.06.008>

213. Ruiz-Medrano J, Montero JA, Flores-Moreno I, Arias L, García-Layana A, Ruiz-Moreno JM. Myopic maculopathy: Current status and proposal for a new classification and grading system (ATN). *Prog Retin Eye Res.* 2019;69(July 2018):80–115.
214. Ohno-Matsui K, Fang Y, Uramoto K, Shinohara K, Yokoi T, Ishida T, et al. Peri-dome Choroidal Deepening in Highly Myopic Eyes With Dome-Shaped Maculas. *Am J Ophthalmol* [Internet]. 2017 Nov 1 [cited 2018 Dec 11];183:134–40. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0002939417303860>
215. Ohno-Matsui K, Lai TYY, Lai CC, Cheung CMG. Updates of pathologic myopia. *Prog Retin Eye Res* [Internet]. 2016;52:156–87. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.preteyeres.2015.12.001>
216. Avila MP, Weiter JJ, Jalkh AE, Trempe CL, Pruett RC, Schepens CL. Natural History of Choroidal Neovascularization in Degenerative Myopia. *Ophthalmology.* 1984;91(12):1573–81.
217. Caillaux V, Gaucher D, Gualino V, Massin P, Tadayoni R, Gaudric A. Morphologic Characterization of Dome-Shaped Macula in Myopic Eyes With Serous Macular Detachment. *Am J Ophthalmol* [Internet]. 2013 Nov 1 [cited 2018 Dec 11];156(5):958-967.e1. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0002939413004479>
218. Itakura H, Kishi S, Li D, Akiyama H. Observation of posterior precortical vitreous pocket using swept-source optical coherence tomography. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2013;54(5):3102–7.
219. Hsiang HW, Ohno-Matsui K, Shimada N, Hayashi K, Moriyama M, Yoshida T, et al. Clinical Characteristics of Posterior Staphyloma in Eyes with Pathologic Myopia. *Am J Ophthalmol* [Internet]. 2008 Jul 1 [cited 2018 Oct 31];146(1):102-110.e2. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0002939408001839?via%3Dihub>
220. Ikuno Y, Sayanagi K, Soga K, Sawa M, Tsujikawa M, Gomi F, et al. Intravitreal Bevacizumab for Choroidal Neovascularization Attributable to Pathological Myopia: One-Year Results. *Am J Ophthalmol.* 2009;147(1).
221. Moriyama M, Ohno-Matsui K, Hayashi K, Shimada N, Yoshida T, Tokoro T, et al. Topographic Analyses of Shape of Eyes with Pathologic Myopia by High-Resolution Three-

- Dimensional Magnetic Resonance Imaging. *Ophthalmology* [Internet]. 2011 Aug 1 [cited 2019 Feb 4];118(8):1626–37. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0161642011000455?via%3Dihub>
222. Ohno-Matsui K. Proposed classification of posterior staphylomas based on analyses of eye shape by three-dimensional magnetic resonance imaging and wide-field fundus imaging. *Ophthalmology*. 2014;121(9):1798–809.
223. Ikuno Y, Fujimoto S, Jo Y, Asai T, Nishida K. Choroidal thinning in high myopia measured by optical coherence tomography. *Clin Ophthalmol*. 2013;7:889–93.
224. Ruiz-Moreno JM, López-Gálvez MI, Donate J, Gomez-Ulla F, García-Arumí J, García-Layana A, et al. Myopic Choroidal Neovascularization. *Ophthalmology* [Internet]. 2011 Dec 1 [cited 2018 Oct 31];118(12):2521–3. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016164201100683X?via%3Dihub>
225. Lorenzo D, Arias L, Alcubierre R, Pujol O, Caminal JM, Rubio M, et al. Intravitreal Ranibizumab for Choroidal Neovascularization Secondary to Pathological Myopia: 12-Month Follow-Up. *Ophthalmologica* [Internet]. 2011 Sep [cited 2020 Apr 14];226(3):103–9. Available from: <https://www.karger.com/Article/FullText/328980>
226. Ohno-Matsui K, Jonas JB, Spaide RF. Macular Bruch Membrane Holes in Choroidal Neovascularization-Related Myopic Macular Atrophy by Swept-Source Optical Coherence Tomography. *Am J Ophthalmol*. 2016 Feb 1;162:133-139.e1.
227. Gaucher D, Haouchine B, Tadayoni R, Massin P, Erginay A, Benhamou N, et al. Long-term Follow-up of High Myopic Foveoschisis: Natural Course and Surgical Outcome. *Am J Ophthalmol*. 2007;143(3).
228. Gaucher D, Erginay A, Lecleire-Collet A, Haouchine B, Puech M, Cohen SY, et al. Dome-Shaped Macula in Eyes with Myopic Posterior Staphyloma. *Am J Ophthalmol*. 2008;145(5).
229. Ohno-Matsui K, Jonas JB, Spaide RF. Macular Bruch Membrane Holes in Highly Myopic Patchy Chorioretinal Atrophy. *Am J Ophthalmol* [Internet]. 2016 Jun 1 [cited 2018 Dec 11];166:22–8. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0002939416301210>
230. Curtin BJ, Karlin DB. Axial Length Measurements and Fundus Changes of the Myopic Eye. *Am J Ophthalmol*. 1971;

231. Mcmonnies CW. An examination of the relation between intraocular pressure, fundal stretching and myopic pathology. *Clin Exp Optom*. 2016;99(2):113–9.
232. Fujiwara T, Imamura Y, Margolis R, Slakter JS, Spaide RF. Enhanced Depth Imaging Optical Coherence Tomography of the Choroid in Highly Myopic Eyes. *Am J Ophthalmol*. 2009 Sep;148(3):445–50.
233. Hayashi K, Ohno-Matsui K, Shimada N, Moriyama M, Kojima A, Hayashi W, et al. Long-term Pattern of Progression of Myopic Maculopathy: A Natural History Study. *Ophthalmology* [Internet]. 2010 Aug 1 [cited 2018 Dec 11];117(8):1595-1611.e4. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0161642009012913>
234. Hayashi K, Ohno-Matsui K, Shimada N, Moriyama M, Kojima A, Hayashi W, et al. Long-term pattern of progression of myopic maculopathy: A natural history study. *Ophthalmology*. 2010;117(8).
235. Ohno-Matsui K, Lai TYY, Lai C-C, Cheung CMG. Updates of pathologic myopia. *Prog Retin Eye Res* [Internet]. 2016 May 1 [cited 2019 May 28];52:156–87. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1350946215300033?via%3Dihub>
236. Cheung CMG, Arnold JJ, Holz FG, Park KH, Lai TYY, Larsen M, et al. Myopic Choroidal Neovascularization: Review, Guidance, and Consensus Statement on Management. *Ophthalmology*. 2017 Nov 1;124(11):1690–711.
237. Leveziel N, Yu Y, Reynolds R, Tai A, Meng W, Caillaux V, et al. Genetic factors for choroidal neovascularization associated with high myopia. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2012;53(8):5004–9.
238. Cheung CMG, Loh BK, Li X, Mathur R, Wong E, Lee SY, et al. Choroidal thickness and risk characteristics of eyes with myopic choroidal neovascularization. *Acta Ophthalmol* [Internet]. 2013 Nov 1 [cited 2020 Apr 15];91(7):e580–1. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/aos.12117>
239. Ruiz-Moreno JM, López-Gálvez MI, Donate J, Gomez-Ulla F, García-Arumí J, García-Layana A, et al. Myopic choroidal neovascularization. Vol. 118, *Ophthalmology*. *Ophthalmology*; 2011. p. 2521–3.
240. Baba T, Ohno-Matsui K, Futagami S, Yoshida T, Yasuzumi K, Kojima A, et al. Prevalence and characteristics of foveal retinal detachment without macular hole in high myopia.

- Am J Ophthalmol. 2003 Mar 1;135(3):338–42.
241. Vanderbeek BL, Johnson MW. The diversity of traction mechanisms in myopic traction maculopathy. *Am J Ophthalmol.* 2012 Jan;153(1):93–102.
 242. Shimada N, Tanaka Y, Tokoro T, Ohno-Matsui K. Natural course of myopic traction maculopathy and factors associated with progression or resolution. *Am J Ophthalmol.* 2013;156(5).
 243. Ohsugi H, Ikuno Y, Matsuba S, Ohsugi E, Nagasato D, Shoujou T, et al. Morphologic characteristics of macular hole and macular hole retinal detachment associated with extreme myopia. *Retina.* 2019;39(7):1312–8.
 244. Schaeffel F, Feldkaemper M. Animal models in myopia research. *Clinical and Experimental Optometry.* 2015.
 245. Wiesel TN, Raviola E. Myopia and eye enlargement after neonatal lid fusion in monkeys [21]. Vol. 266, *Nature.* Nature Publishing Group; 1977. p. 66–8.
 246. Yinon U, Rose L, Shapiro A. Myopia in the eye of developing chicks following monocular and binocular lid closure. *Vision Res.* 1980 Jan 1;20(2):137–41.
 247. Tejedor J, De la Villa P. Refractive changes induced by form deprivation in the mouse eye. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2003 Jan 1;44(1):32–6.
 248. Barathi VA, Boopathi VG, Yap EPH, Beuerman RW. Two models of experimental myopia in the mouse. *Vision Res.* 2008;
 249. Zhu X, Wallman J. Temporal properties of compensation for positive and negative spectacle lenses in chicks. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2009;
 250. Edwards MH. Animal models of myopia A Review The work of Francis Young. *Acta Ophthalmol Scand.* 1996;74:213–9.
 251. Morgan IG, Ashby RS, Nickla DL. Form deprivation and lens-induced myopia: are they different? *Ophthalmic Physiol Opt [Internet].* 2013 May [cited 2020 Apr 18];33(3):355–61. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/opo.12059>
 252. Troilo D, Smith EL, Nickla DL, Ashby R, Tkatchenko A V., Ostrin LA, et al. Imi – Report on experimental models of emmetropization and myopia. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2019;60(3):M31–88.

253. Jiang X, Kurihara T, Kunimi H, Miyauchi M, Ikeda SI, Mori K, et al. A highly efficient murine model of experimental myopia. *Sci Rep* [Internet]. 2018;8(1):1–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-20272-w>
254. Wisely CE, Sayed JA, Tamez H, Zelinka C, Abdel-Rahman MH, Fischer AJ, et al. The chick eye in vision research: An excellent model for the study of ocular disease. *Prog Retin Eye Res* [Internet]. 2017 Nov 1 [cited 2018 Oct 10];61:72–97. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1350946217300149?via%3Dihub>
255. Schaeffel F, Feldkaemper M. Animal models in myopia research. *Clin Exp Optom*. 2015;98(6):507–17.
256. Slijkerman RWN, Song F, Astuti GDN, Huynen MA, van Wijk E, Stieger K, et al. The pros and cons of vertebrate animal models for functional and therapeutic research on inherited retinal dystrophies. Vol. 48, *Progress in Retinal and Eye Research*. Elsevier Ltd; 2015. p. 137–59.
257. Kram YA, Mantey S, Corbo JC. Avian cone photoreceptors tile the retina as five independent, self-organizing mosaics. *PLoS One*. 2010;5(2).
258. Bueno JM, Giakoumaki A, Gualda EJ, Schaeffel F, Artal P. Analysis of the chicken retina with an adaptive optics multiphoton microscope. *Biomed Opt Express*. 2011;2(6):1637.
259. Young TL. Molecular genetics of human myopia: an update. *Optom Vis Sci*. 2009;86(1):E8–22.
260. Williams KM, Bertelsen G, Cumberland P, Wolfram C, Verhoeven VJM, Anastasopoulos E, et al. Increasing Prevalence of Myopia in Europe and the Impact of Education. *Ophthalmology* [Internet]. 2015;122(7):1489–97. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ophtha.2015.03.018>
261. Holden BA, Fricke TR, Wilson DA, Jong M, Naidoo KS, Sankaridurg P, et al. Global Prevalence of Myopia and High Myopia and Temporal Trends from 2000 through 2050. *Ophthalmology* [Internet]. 2016;123(5):1036–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ophtha.2016.01.006>
262. Cambiaghi A, Ferrario M, Masseroli M. Analysis of metabolomic data: Tools, current strategies and future challenges for omics data integration. *Brief Bioinform*. 2017;18(3):498–510.
263. Misra BB. New tools and resources in metabolomics: 2016–2017. *Electrophoresis*.

2018;39(7):909–23.

264. Barbas-Bernardos C, Armitage EG, García A, Mérida S, Navea A, Bosch-Morell F, et al. Looking into aqueous humor through metabolomics spectacles – exploring its metabolic characteristics in relation to myopia. *J Pharm Biomed Anal* [Internet]. 2016;127:18–25. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2016.03.032>
265. Toomey CB, Johnson L V., Bowes Rickman C. Complement factor H in AMD: Bridging genetic associations and pathobiology. Vol. 62, *Progress in Retinal and Eye Research*. Elsevier Ltd; 2018. p. 38–57.
266. Hajishengallis G, Reis ES, Mastellos DC, Ricklin D, Lambris JD. Novel mechanisms and functions of complement. *Nat Immunol*. 2017;18(12):1288–98.
267. Edwards AO, Ritter R, Abel KJ, Manning A, Panhuysen C, Farrer LA. Complement factor H polymorphism and age-related macular degeneratioEdwards, A. O., Ritter, R., Abel, K. J., Manning, A., Panhuysen, C., & Farrer, L. A. (2005). Complement factor H polymorphism and age-related macular degeneration. *Science*, 308(5720), 421. *Science* (80-). 2005;308(5720):421–4.
268. Micelli-Ferrari T, Vendemiale G, Grattagliano I, Boscia F, Arnese L, Altomare E, et al. Role of lipid peroxidation in the pathogenesis of myopic and senile cataract. *Br J Ophthalmol* [Internet]. 1996 [cited 2021 Feb 2];80(9):840–3. Available from: </pmc/articles/PMC505624/?report=abstract>
269. Romero FJ, Bosch-Morell F, Romero MJ, Jareño EJ, Romero B, Marín N, et al. Lipid peroxidation products and antioxidants in human disease. In: *Environmental Health Perspectives* [Internet]. Public Health Services, US Dept of Health and Human Services; 1998 [cited 2021 Feb 2]. p. 1229–34. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9788902/>
270. Simonelli F, Nesti A, Pensa M, Romano L, Savastano S, Rinaldi E, et al. Lipid peroxidation and human cataractogenesis in diabetes and severe myopia. *Exp Eye Res* [Internet]. 1989 [cited 2021 Feb 2];49(2):181–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2767166/>
271. Krilis M, Qi M, Madigan MC, Wong JWH, Abdelatti M, Guymer RH, et al. Nitration of tyrosines in complement factor H domains alters its immunological activity and mediates a pathogenic role in age related macular degeneration. *Oncotarget*. 2017;8(30):49016–

32.

272. Scholl HPN, Issa PC, Walier M, Janzer S, Pollok-Kopp B, Börncke F, et al. Systemic complement activation in age-related macular degeneration. *PLoS One*. 2008 Jul 2;3(7):e2593.
273. Shahulhameed S, Vishwakarma S, Chhablani J, Tyagi M, Pappuru RR, Jakati S, et al. A Systematic Investigation on Complement Pathway Activation in Diabetic Retinopathy. *Front Immunol*. 2020;11(February):154.
274. Krilis M, Qi M, Qi J, Wong JWH, Guymer R, Liew G, et al. Dual roles of different redox forms of complement factor H in protecting against age related macular degeneration. *Free Radic Biol Med*. 2018 Dec 1;129:237–46.
275. Conley YP, Jakobsdottir J, Mah T, Weeks DE, Klein R, Kuller L, et al. CFH, ELOVL4, PLEKHA1 and LOC387715 genes and susceptibility to age-related maculopathy: AREDS and CHS cohorts and meta-analyses. *Hum Mol Genet*. 2006;15(21):3206–18.
276. Yaspan BL, Williams DF, Holz FG, Regillo CD, Li Z, Dressen A, et al. Targeting factor D of the alternative complement pathway reduces geographic atrophy progression secondary to age-related macular degeneration. *Sci Transl Med*. 2017;9(395):1–14.
277. Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, Lambris JD. Complement: A key system for immune surveillance and homeostasis. Vol. 11, *Nature Immunology*. 2010. p. 785–97.
278. Francisco BM, Salvador M, Amparo N. Oxidative stress in myopia. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2015.
279. Siegart JT, Norton TT. The time course of changes in mRNA levels in tree shrew sclera during induced myopia and recovery. *Investig Ophthalmol Vis Sci* [Internet]. 2002 [cited 2020 Jun 22];43(7):2067–75. Available from: [/pmc/articles/PMC1994662/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1223317/)
280. Zhuang H, Zhang R, Shu Q, Jiang R, Chang Q, Huang X, et al. Changes of TGF- β 2, MMP-2, and TIMP-2 levels in the vitreous of patients with high myopia. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2014;252(11):1763–7.
281. Jia Y, Hu DN, Sun J, Zhou J. Correlations Between MMPs and TIMPs Levels in Aqueous Humor from High Myopia and Cataract Patients. *Curr Eye Res* [Internet]. 2017;42(4):600–3. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/02713683.2016.1223317>

282. Blobe GC, Schieman WP, Lodish HF. Role of transforming growth factor β in human disease [Internet]. Vol. 342, New England Journal of Medicine. N Engl J Med; 2000 [cited 2020 Jun 24]. p. 1350–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10793168/>
283. Inatani M, Tanihara H, Katsuta H, Honjo M, Kido N, Honda Y. Transforming growth factor- β 2 levels in aqueous humor of glaucomatous eyes. Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol [Internet]. 2001 [cited 2020 Jun 24];239(2):109–13. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11372538/>
284. Jobling AI, Nguyen M, Gentle A, McBrien NA. Isoform-specific Changes in Scleral Transforming Growth Factor- β Expression and the Regulation of Collagen Synthesis during Myopia Progression. J Biol Chem [Internet]. 2004 Apr 30 [cited 2020 Jun 24];279(18):18121–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14752095/>
285. Wang SR, Ye JJ, Long Q. Expressions of collagen I, matrix metalloproteinases-2, and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 in the posterior sclera of newborn guinea pigs with negative lens-defocused myopia. Acta Acad Med Sin [Internet]. 2010 [cited 2020 Jun 24];32(1):55–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20236589/>
286. Tosi GM, Neri G, Caldi E, Fusco F, Bacci T, Tarantello A, et al. Publisher Correction: TGF- β concentrations and activity are down-regulated in the aqueous humor of patients with neovascular age-related macular degeneration (Scientific Reports (2018) DOI: 10.1038/s41598-018-26442-0). Scientific Reports. 2018.
287. Nakamura T, Sakai K, Nakamura T, Matsumoto K. Hepatocyte growth factor twenty years on: Much more than a growth factor. J Gastroenterol Hepatol. 2011;26(SUPPL. 1):188–202.
288. Jin ML, Yaung J, Kannan R, He S, Ryan SJ, Hinton DR. Hepatocyte growth factor protects RPE cells from apoptosis induced by glutathione depletion. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2005;46(11):4311–9.
289. Veerappan S, Pertile KK, Islam AFM, Schäche M, Chen CY, Mitchell P, et al. Role of the Hepatocyte Growth Factor Gene in Refractive Error. Ophthalmology [Internet]. 2010;117(2):239-245.e2. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ophtha.2009.07.002>
290. Hu W, Criswell MH, Fong SL, Temm CJ, Rajashekhar G, Cornell TL, et al. Differences in the temporal expression of regulatory growth factors during choroidal neovascular

- development. *Exp Eye Res* [Internet]. 2009;88(1):79–91. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.exer.2008.10.014>
291. Yanovitch T, Li YJ, Metlapally R, Abbott D, Viet KNT, Young TL. Hepatocyte growth factor and myopia: Genetic association analyses in a caucasian population. *Mol Vis*. 2009;15(February):1028–35.
 292. Gaggioli C, Deckert M, Robert G, Abbe P, Batoz M, Ehrenguber MU, et al. HGF induces fibronectin matrix synthesis in melanoma cells through MAP kinase-dependent signaling pathway and induction of Egr-1. *Oncogene* [Internet]. 2005 Feb 17 [cited 2020 Jun 24];24(8):1423–33. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15608673/>
 293. Han W, Yap MKH, Wang J, Shea PY. Family-based association analysis of hepatocyte growth factor (HGF) gene polymorphisms in high myopia. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47(6):2291–9.
 294. McBrien NA, Gentle A. Role of the sclera in the development and pathological complications of myopia. *Prog Retin Eye Res*. 2003;22(3):307–38.
 295. Grimm C, Willmann G. Hypoxia in the Eye: A Two-Sided Coin. *High Alt Med Biol*. 2012;
 296. McNulty R, Wang H, Mathias RT, Ortwerth BJ, Truscott RJW, Bassnett S. Regulation of tissue oxygen levels in the mammalian lens. *J Physiol* [Internet]. 2004 Sep 15 [cited 2020 Jun 29];559(3):883–98. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15272034/>
 297. Safvati A, Cole N, Hume E, Willcox M. Mediators of neovascularization and the hypoxic cornea. [Internet]. Vol. 34, Current eye research. *Curr Eye Res*; 2009 [cited 2020 Jun 29]. p. 501–14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19899985/>
 298. Zhao F, Zhang D, Zhou Q, Zhao F, He M, Yang Z, et al. Scleral HIF-1 α is a prominent regulatory candidate for genetic and environmental interactions in human myopia pathogenesis. *EBioMedicine* [Internet]. 2020 Jul 1 [cited 2021 Feb 3];57. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32652319/>
 299. Neelam S, Brooks MM, Cammarata PR. Lenticular Cytoprotection. Part 1: The Role of Hypoxia Inducible Factors-1 α and -2 α and Vascular Endothelial Growth Factor in Lens Epithelial Cell Survival in Hypoxia. *Mol Vis*. 2013;19(January):1–15.
 300. Krishna Vadlapatla R, Dutt Vadlapudi A, Mitra AK. Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1): A Potential Target for Intervention in Ocular Neovascular Diseases HHS Public Access. *Curr Drug Targets*. 2013;14(8):919–35.

301. Tong L, Cui D, Zeng J. Topical bendazol inhibits experimental myopia progression and decreases the ocular accumulation of HIF-1 α protein in young rabbits. *Ophthalmic Physiol Opt* [Internet]. 2020 Sep 1 [cited 2021 Feb 3];40(5):567–76. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32839973/>
302. Mérida S, Villar VM, Navea A, Desco C, Sancho-tello M, Peris C, et al. Imbalance Between Oxidative Stress and Growth Factors in Human High Myopia. 2020;11(May):1–10.
303. Michalska-Matecka K, Kabiesz A, Nowak M, Śpiewak D. Age related macular degeneration – challenge for future: Pathogenesis and new perspectives for the treatment. *Eur Geriatr Med* [Internet]. 2015 Feb 1 [cited 2019 May 28];6(1):69–75. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878764914001995>
304. Chen S, Zhou M, Wang W, Wu H, Yu X, Huang W, et al. Levels of angiogenesis-related vascular endothelial growth factor family in neovascular glaucoma eyes. *Acta Ophthalmol*. 2015;93(7):e556–60.
305. Tufail A, Narendran N, Patel PJ, Sivaprasad S, Amoaku W, Browning AC, et al. Ranibizumab in Myopic Choroidal Neovascularization: The 12-Month Results from the REPAIR Study. *Ophthalmology* [Internet]. 2013 Sep 1 [cited 2018 Oct 31];120(9):1944-1945.e1. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0161642013005010?via%3Dihub>
306. Blom IE, Goldschmeding R, Leask A. Gene regulation of connective tissue growth factor: new targets for antifibrotic therapy? *Matrix Biol* [Internet]. 2002 Oct 1 [cited 2019 May 28];21(6):473–82. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0945053X02000550?via%3Dihub>
307. Li SY, Fu ZJ, Lo ACY. Hypoxia-induced oxidative stress in ischemic retinopathy. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2012.
308. Kim KL, Seo S, Kim JT, Kim J, Kim W, Yeo Y, et al. SCF (Stem Cell Factor) and cKIT modulate pathological ocular neovascularization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2019;39(10):2120–31.
309. Fan X, Heijnen CJ, van der Kooij MA, Groenendaal F, van Bel F. The role and regulation of hypoxia-inducible factor-1 α expression in brain development and neonatal hypoxic–ischemic brain injury. *Brain Res Rev* [Internet]. 2009 Dec 11 [cited 2018 Oct 30];62(1):99–

108. Available from:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165017309001003?via%3Dihub>
310. Xu H, Chen M, Manivannan A, Lois N, Forrester J V. Age-dependent accumulation of lipofuscin in perivascular and subretinal microglia in experimental mice. *Aging Cell*. 2008;7(1):58–68.
311. Shen WY, Yu MJT, Barry CJ, Constable IJ, Rakoczy PE. Expression of cell adhesion molecules and vascular endothelial growth factor in experimental choroidal neovascularisation in the rat. *Br J Ophthalmol* [Internet]. 1998 [cited 2020 Jul 2];82(9):1063–71. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9893599/>
312. Tuo J, Grob S, Zhang K, Chan CC. Genetics of immunological and inflammatory components in age-related macular degeneration. *Ocul Immunol Inflamm* [Internet]. 2012 Feb [cited 2020 Jul 3];20(1):27–36. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22324898/>
313. Richards A, Kavanagh D, Atkinson JP. Inherited Complement Regulatory Protein Deficiency Predisposes to Human Disease in Acute Injury and Chronic Inflammatory StatesThe Examples of Vascular Damage in Atypical Hemolytic Uremic Syndrome and Debris Accumulation in Age-Related Macular Degeneration [Internet]. Vol. 96, *Advances in Immunology*. *Adv Immunol*; 2007 [cited 2020 Jul 3]. p. 141–77. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17981206/>
314. Khandhadia S, Cipriani V, Yates JRW, Lotery AJ. Age-related macular degeneration and the complement system [Internet]. Vol. 217, *Immunobiology*. *Immunobiology*; 2012 [cited 2020 Jul 3]. p. 127–46. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21868123/>
315. Tarallo V, Hirano Y, Gelfand BD, Dridi S, Kerur N, Kim Y, et al. DICER1 loss and Alu RNA induce age-related macular degeneration via the NLRP3 inflammasome and MyD88. *Cell* [Internet]. 2012 May 11 [cited 2020 Jul 3];149(4):847–59. Available from: </pmc/articles/PMC3351582/?report=abstract>