EFECTO DE LA APLICACIÓN INTRAVÍTREA DE CÉLULAS ESTROMALES MESENQUIMALES EN LA RESPUESTA INFLAMATORIA INTRAOCULAR EN UN MODELO ANIMAL EXPERIMENTAL DE HIPERTENSIÓN OCULAR

KARINE DOS SANTOS EVANGELHO

Documento de tesis presentado como requisito para optar al título de

Doctora en Ciencias Biomédicas y Biológicas

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS Y BIOLÓGICAS

UNIVERSIDAD DEL ROSARIO BOGOTÁ, D.C.

2024

EFECTO DE LA APLICACIÓN INTRAVÍTREA DE CÉLULAS ESTROMALES MESENQUIMALES EN LA RESPUESTA INFLAMATORIA INTRAOCULAR EN UN MODELO ANIMAL EXPERIMENTAL DE HIPERTENSIÓN OCULAR

Estudiante: Karine dos Santos Evangelho

Director: Ligia Alejandra de-la-Torre Cifuentes, MD, PhD

Codirectora: Heily Carolina Ramírez Santana, PhD

Documento de tesis presentado como requisito para optar al título de

Doctora en Ciencias Biomédicas y Biológicas

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS Y BIOLÓGICAS

UNIVERSIDAD DEL ROSARIO BOGOTÁ, D.C.

2024

AGRADECIMIENTOS

Como todos sabemos, una tesis doctoral no es el trabajo de una sola persona; muchas personas me han acompañado e intervenido de una u otra forma en su desarrollo.

Debo comenzar expresando mi más profundo agradecimiento a la **Dra. Ligia Alejandra de la Torre Cifuentes**, directora de esta tesis, a quien no solo debo agradecerle por haber guiado su desarrollo y finalización, sino también por todo lo que he logrado durante el transcurso de este trabajo. Su incansable dedicación me ha transmitido los conocimientos, la seguridad y los consejos necesarios en el mundo de la investigación. Le agradezco la oportunidad de haberme admitido en este proyecto y su continua preocupación por mi formación. A pesar de todas las dificultades que enfrentamos, logramos salir adelante con mucha "**Actitud**" (palabra que define este doctorado). ¡La admiro profundamente!

Extiendo mi agradecimiento a la **Dra. Heily Carolina Ramírez Santana**, codirectora de esta tesis. Primero, le agradezco por aceptar ser mi codirectora, incluso cuando la tesis ya estaba en ejecución. Segundo, por brindarme la oportunidad de adentrarme en el laboratorio (CREA) y ofrecerme más conocimientos en la fase experimental, algo que siempre apreciaré. En este punto, también debo reconocer a la **Dra. Diana M. Monsalve** y a la **Dra. Yeny Acosta-Ampudia** por compartir sus conocimientos, por su paciencia y por las horas dedicadas a la interpretación de muestras. Agradezco igualmente al equipo del **Dr. Gustavo Salguero** por proporcionarnos las células madre. Valoro enormemente todo lo que me han enseñado.

Quisiera agradecer a la Escuela Superior de Oftalmología del Instituto Barraquer de América por abrirme sus puertas, permitiendo que una graduada en medicina veterinaria que ama la oftalmología pudiera trabajar en este campo, y principalmente por creer en el potencial de este estudio. Por supuesto, también expreso mi agradecimiento a la **Dra. Clemencia De Vivero Arciniegas**, quien me ha enseñado y aconsejado en la práctica experimental con determinación y paciencia, pero, sobre todo, por darme confianza cuando más la necesitaba.

Por último, quiero expresar mi más sincero agradecimiento a lo más valioso que tengo, mi familia. Todo lo que he conseguido ha sido gracias a ustedes. A mi esposo, Sergio, por apoyarme incondicionalmente y por enseñarme a luchar por nuestros sueños sin rendirme nunca. A mis hijas, Luna y Alanna, por su paciencia al no tener siempre a su mamá presente, pero comprendiendo que esto era algo que me haría feliz. Sin el aporte de cada una de estas personas, nada de lo que viene a continuación hubiera sido posible.

Mis sinceros agradecimientos

RESUMEN

Se proyecta que más de 80 millones de personas padecerán glaucoma al final de esta década. Esta condición, que aún no cuenta con una solución definitiva, requiere el desarrollo de alternativas terapéuticas más eficaces. Recientemente, la investigación sobre la fisiopatología del glaucoma se ha centrado en comprender los efectos de la respuesta inmune en el daño a las células ganglionares de la retina (CGRs) y en su protección. Las CGRs desempeñan un papel crucial, ya que son las neuronas aferentes responsables de transmitir la información visual al cerebro a través de sus axones, los cuales forman el nervio óptico. La muerte de estas células conlleva ceguera irreversible. El estudio de los mecanismos inmunológicos involucrados en el glaucoma podría proporcionar nuevas vías para el tratamiento y la prevención de esta enfermedad, que puede llevar a la discapacidad visual.

Se ha encontrado que un desequilibrio en el perfil de citoquinas producidas por las células T puede modificar el microambiente inmunológico en ojos glaucomatosos, influyendo así en la neuropatía óptica. Por lo tanto, las estrategias para bloquear o neutralizar las citoquinas relacionadas con el proceso neurodegenerativo en el glaucoma podrían representar un mecanismo terapéutico prometedor para proteger las neuronas y prevenir una mayor pérdida de la capacidad visual. Este hallazgo sugiere avances hacia tratamientos más efectivos que podrían mejorar la calidad de vida de los pacientes con glaucoma y reducir la gravedad de esta enfermedad.

En este contexto neuroprotector, las células estromales mesenquimales (MSCs) están emergiendo como fuertes candidatas para ser utilizadas como terapia celular en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, dado su considerable potencial regenerativo y su capacidad inmunosupresora. Esta investigación tiene como objetivo principal evaluar el perfil de determinadas citoquinas en el humor acuoso y vítreo en un modelo prospectivo, in vivo, experimental de hipertensión ocular (HO), así como su relación con la respuesta inmune intraocular en ojos tratados con inyección intravítrea de células estromales mesenquimales de gelatina de Wharton humana (WJ-MSCs).

Esta investigación se llevó a cabo en el Bioterio y la Sala de Cirugía Experimental de la Escuela Superior de Oftalmología del Instituto Barraquer de América, tras recibir la aprobación del Comité de Ética en Investigación con Animales (CEIA-ESO-IBA). El estudio se dividió en dos etapas experimentales: un estudio piloto y una fase experimental. En el estudio piloto, se realizó la estandarización del modelo de HO para ajustar las dosis del medicamento y la medición de la presión

intraocular (PIO). Se utilizaron cuatro conejos machos de la raza Nueva Zelanda, divididos en dos grupos experimentales asignados aleatoriamente durante un período de 4 semanas. Además de estandarizar el modelo de HO mediante la instilación de acetato de prednisolona tópica dos veces al día y la aplicación semanal de acetato de betametasona subconjuntival, se adaptaron técnicas para evaluar la respuesta pupilar fotocromática, realizar estudios histológicos y definir los marcadores inflamatorios utilizados en la investigación. Basándose en los resultados obtenidos en el estudio piloto, se desarrolló la fase experimental.

Todos los animales del estudio fueron sometidos a un examen clínico detallado, que incluyó la inspección de mucosas, dentición, piel y anexos, además de un examen oftalmológico completo. Aquellos que presentaron enfermedades de la superficie ocular, opacidad del cristalino, enfermedades inflamatorias sistémicas, lesión retiniana o pérdida de peso severa (≥10% del peso inicial) fueron excluidos del estudio. En la fase experimental, se utilizaron 15 animales, divididos aleatoriamente en tres grupos: grupo 1 (HO), grupo 2 (trasplante intravítreo de WJ-MSCs) y grupo 3 (HO y trasplante intravítreo de WJ-MSCs). Se inyectaron 10^5/100µL de WJ-MSCs intravítreas en la semana 7 del estudio, asignando el ojo izquierdo como control.

En este estudio, se evaluaron los efectos de las WJ-MSCs en la retina mediante Tomografía de Coherencia Óptica (OCT), PEV flash y Respuesta Pupilar Fotocromática (RPF). La retinografía reveló cambios vasculares en la retina, excavación de la copa óptica y alteraciones en la coloración del disco óptico en el grupo 1, mientras que en el grupo 3 se observó una solución de WJ-MSCs localizada sobre el nervio óptico. La OCT mostró una reducción en la capa de células ganglionares de la retina (CCGRs) en el grupo 1, pero un ligero aumento en el grupo 3. Además, los animales tratados con WJ-MSCs presentaron menos alteraciones en la retina y el nervio óptico en comparación con el grupo de HO, incluida una mayor preservación de las CGRs observada mediante histología, lo que indica un efecto beneficioso de la terapia celular.

Se observó un posible efecto terapéutico del trasplante celular en la RPF, con un aumento significativo en la respuesta de contracción pupilar a la luz azul solo en las primeras semanas del estudio en el grupo de HO que recibió WJ-MSCs, lo que podría indicar un efecto neuroprotector y axogénico de la terapia celular en la retina. Sin embargo, las WJ-MSCs no lograron restablecer la función de las células ganglionares ni del nervio óptico según el PEV flash.

Además, se midieron los niveles de citoquinas en humor acuoso (IL-6, IL-8, factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α)) y humor vítreo (interferón (IFN-γ), IL-10 y factor de crecimiento transformante beta (TGF-β)) mediante la técnica de inmunoensayo ELISA. Se evaluó también la expresión de células

TCD3+, TCD3+/TCD4+ y TCD3+/TCD8+, así como de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) e inmunohistoquímica en retina y en el nervio óptico después de la aplicación intravítrea de WJ-MSCs, con el fin de analizar el efecto neuroprotector de la terapia celular y su relación con las respuestas inmune e inflamatoria.

Se evidenció una disminución en la secreción de citoquinas específicas, como TNF-α, IL-6, IFN-γ, IL-10 e IL-8, en el grupo 3 en comparación con el grupo 1. Además, se observó un aumento en la concentración de TGF-β en humor vítreo después de la aplicación de WJ-MSCs. Al evaluar la infiltración de células TCD3+/TCD4+ en la CCGRs, se observó que el grupo 3 presentaba una infiltración leve, mientras que el grupo 1 no mostró infiltración celular, lo que sugiere un posible efecto inmunomodulador sobre las células TCD4+ mediante la neuroprotección en esta capa de la retina. Por otro lado, la infiltración retiniana de células TCD3+ en todos los grupos tendía a pertenecer más a la subpoblación de células TCD8+ que a las células TCD4+ en varias capas de la retina, lo que indica que la inmunidad celular puede desempeñar un papel en la neuropatía óptica glaucomatosa. Asimismo, se observó una fuerte expresión de GFAP en la retina y en el nervio óptico en todos los grupos del estudio.

Además de los resultados descritos, el trasplante de WJ-MSCs de cordón umbilical mostró buenos perfiles de seguridad y pocos eventos adversos en el modelo experimental propuesto. En conjunto, los hallazgos de este estudio sugieren que las células estromales derivadas del cordón umbilical pueden ser una fuente celular prometedora para la neuroprotección en la enfermedad glaucomatosa.

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE ABREVIATURAS 9

LISTA DE FIGURAS 11

LISTA DE TABLAS 14

DIVULGACIÓN CIENTÍFICA 15

1. MARCO TEÓRICO 18

1.1 Medios transparentes del ojo: humor acuoso y humor vítreo 18

1.1.1 Humor Acuoso: Composición y Funciones *18*

1.1.2 Humor Vítreo *19*

1.2 Retina y Nervio Óptico *21*

1.3 Glaucoma 26

1.3.1 Clasificación del glaucoma *30*

1.3.2 Diagnóstico del glaucoma *33*

1.4 Sistema inmune: Una visión general 39

1.4.1 Sistema Inmune Innato *40*

1.4.2 Sistema Inmune Adquirido *41*

1.4.3 Inmunología Ocular *44*

1.4.4 Respuesta inmune en glaucoma *55*

1.4.5 Citoquinas pro y antinflamatorias asociadas a la neurodegeneración glaucomatosa *61*

1.5 Las células madre *67*

1.5.1 Células madre mesenquimales 68

1.5.2 Neuroprotección con células madre 73

2. HIPÓTESIS DEL TRABAJO 76

3. OBJETIVOS *76*

4. MATERIALES Y MÉTODOS 80

4.1 Tipo de estudio 80

4.2 Consideraciones éticas 80

4.3 Tamaño de la muestra 81

4.4 Animales de experimentación e Instalaciones 81

4.5 Diseño experimental 87

5. INTRODUCCIÓN A LOS CAPÍTULOS 118

CAPÍTULO 1: *"*Diseñar y estandarizar un modelo experimental con signos tempranos de hipertensión ocular en conejos Nueva Zelanda.*"* 123

CAPÍTULO 2: "Describir los cambios morfológicos y funcionales observados en la retina y el nervio óptico en el modelo experimental de hipertensión ocular antes y después de la intervención con células estromales mesenquimales." 154
CAPÍTULO 3: "Evaluar el efecto neuroprotector de la aplicación de células estromales mesenquimales en la retina y nervio óptico, así como su relación con las respuestas inmune e inflamatoria." 186

6. DISCUSIÓN 210

LIMITACIONES DEL ESTUDIO 228

CONCLUSIONES 229

REFERENCIAS 231

ANEXOS 268

LISTA DE ABREVIATURAS

MSCs	Células estromales mesenquimales
WJ-MSCs	Células estromales mesenquimales de gelatina de Wharton humana
CEIA-ESO-IBA	Comité de Ética en Investigación con Animales Escuela Superior de Oftalmología del Instituto Barraquer de América
PIO	Presión intraocular
OCT	Tomografía de Coherencia Óptica
Flash-PEV	Potenciales evocados visuales flash
RPF	Respuesta Pupilar Fotocromática
IL	Interleucina
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta
IFN-γ	Interferón gamma
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
CGRs	Células ganglionares de la retina
CCGRs	Capa de células ganglionares
EP	Epitelio pigmentario
SF	Segmentos de los Fotorreceptores
MLE	Membrana Limitante Externa
CPE	Capa plexiforme externa
CPI	Capa plexiforme interna
CNE	Capa nuclear externa
CNI	Capa nuclear interna
MLI	Membrana limitante Interna
CNO	Cabeza del nervio óptico
GPAA	Glaucoma primario de ángulo abierto
BFGF	Factor de crecimiento fibroblástico básico
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
MT	Malla trabecular
NMDA	N-methyl-D-aspartate
AMPA	Ácido α-amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
ATP	Adenosín trifosfato
ROS	Especies reactivas de oxígeno
HO	Hipertensión ocular
GCs	Glucocorticoides
CFNR	Capa de fibras nerviosas retinianas
ipCGRs	CGRs intrínsecamente fotosensibles
NK	Células asesinas naturales

TLR	Receptores tipo Toll
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
ICAM	Moléculas de adhesión intercelular
CPA	Célula presentadora del antígeno
HMC	Complejo mayor de histocompatibilidad
Ig	Inmunoglobulinas
Th	T helper
ACAID	Desviación Inmune Asociada a la Cámara Anterior
HSP	Proteínas de choque térmico
Iba-1	*Ionized calcium binding adapter molecule*
NOS	Óxido nítrico sintasa
ON	Óxido nítrico
SNC	Sistema nervioso central
pDC	Células dendríticas plasmocitoides
α-MSH	Hormona estimulante de los melanocitos
VIP	Péptido intestinal vasoactivo
RANTES	regulado en la activación, células T normales expresadas y secretadas
M-CSF	Factor estimulante de colonias de macrófagos
MMP	Metaloproteinasas de matriz
MEC	Matriz extracelular
BMMSCs	Células madre mesenquimales dervivadas de médula ósea
GALT	Tejido linfoide asociado al intestino
MALT	Tejido linfoide asociado a mucosa
DT	Desviación típica
P	p-valor
DP	Duplicación de la población
PDT	Duplicación de la población
Total	

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Drenaje humor acuoso 19
Figura 2: Imagen aplicación substancia en humor vítreo 20
Figura 3: Imágenes de la retina de mamífero 22
Figura 4: Teorías de la neuropatía glaucomatosa 28
Figura 5: Imagen fondo de ojo paciente humano 34
Figura 6: Análisis flash-PEV 36
Figura 7: Principales células activadas en la Prueba Respuesta Pupilar Fotocromática 37
Figura 8: Principio fisiológico de la Prueba de Respuesta Pupilar Fotocromática 38
Figura 9: Evolución cronológica de la respuesta inmune 39
Figura 10: Activación de linfocitos y producción de citoquinas 43
Figura 11: Localización de células inmunes residentes en los tejidos oculares 46
Figura 12: Representación esquemática del ACAID frente a un daño ocular 49
Figura 13: Mecanismo de muerte celular 51
Figura 14: Activación de CPA en el segmento posterior 54
Figura 15: Esquema representativo de la alteración de la malla trabecular con consecuente aumento de la PIO con el uso de glucocorticoides 56
Figura 16: Tipos celulares encontrados en la enfermedad glaucomatosa 58
Figura 17: Esquema representativo de la neuro inflamación en el segmento posterior e inducción de muerte celular 60
Figura 18: Anatomía del cordón umbilical 70
Figura 19: Muestra experimental 82
Figura 20: Técnica de contención y sujeción utilizadas en los animales en la presente investigación 86
Figura 21: Diseño experimental del estudio piloto 88
Figura 22: Inducción de hipertensión ocular 90
Figura 23: Medidas de la PIO 91
Figura 24: Estudio histopatológico 92
Figura 25: Diseño Experimental 94

Figura 26: Metodología seguida para el aislamiento de WJ-MSCs a partir de cordón umbilical humano 96
Figura 27: Metodología seguida para el análisis de cultivo celular de WJ-MSCs a partir de cordón umbilical humano 97
Figura 28: Crioconservación de las células WJ-MSCs, seguido de análisis celular 98
Figura 29: Análisis de expansión celular 99
Figura 30: Capacidad de diferenciación de las WJ-MSCs 101
Figura 31: Técnica de aplicación intravítrea de WJ-MSCs 104
Figura 32: Tomografía de Coherencia Óptica 105
Figura 33: Descripción de las imágenes OCT 106
Figura 34: Técnica de Retinografía realizada en conejo Nueva Zelanda 108
Figura 35: Manejo del animal para trazados de flash-PEV 109
Figura 36: Técnica de colecta de muestras de humor acuoso 111
Figura 37: Protocolo utilizado para la realización de la técnica de Elisa 112
Figura 38: Metodología utilizada para el procesamiento de las muestras de humor acuoso en citometría de flujo 114
Figura 39: Material utilizados para las técnicas de histología e inmunohistoquímica en los animales 115
Figura 40: Imágenes comparativas del ojo de conejo y del ser humano 127
Figura 41: Gráfico demostrando medidas de PIO en los grupos experimentales 149
Figura 42: Gráficos BloxPlot demostrando medidas de PIO durante el día 150
Figura 43: Cambios oftalmológicos observados en el modelo animal experimental en el transcurso del estudio *post* aplicación intravítrea de WJ-MSCs 151
Figura 44: Retinografía: evaluación del segmento posterior en el grupo de hipertensión ocular . 152
Figura 45: Evaluación del segmento posterior en los grupos trasplantados con WJ-MSCs 153
Figura 46: Análisis de histología *post* inducción de hipertensión ocular y trasplante intravítreo de WJ-MSCs demostrando algunas de las alteraciones encontradas 167
Figura 47: Efecto del uso de glucocorticoides tópicos y subconjuntivales en la estructura del ángulo iridocorneal en ojos de conejos 168
Figura 48: Clasificación histológica de la muerte de CGRs después de la inducción de hipertensión ocular y trasplante intravítreo de WJ-MSCs 169

Figura 49: Clasificación histológica de la vacuolización en la CCGRs después de la inducción de hipertensión ocular y trasplante intravítreo de WJ-MSCs 170
Figura 50: Clasificación histológica de hipertrofia en la CCGRs después de la inducción de hipertensión ocular y trasplante intravítreo de WJ-MSCs 171
Figura 51: Clasificación histológica de vacuolización en la CNI después de la inducción de hipertensión ocular y trasplante intravítreo de WJ-MSCs 172
Figura 52: Clasificación histológica de hipertrofia en la CNI después de la inducción de hipertensión ocular y trasplante intravítreo de WJ-MSCs..... 173
Figura 53: Análisis de histología post inducción de hipertensión ocular y trasplante intravítreo de WJ-MSCs..... 174
Figura 54: Clasificación histológica de gliosis en el nervio óptico después de la inducción de hipertensión ocular y trasplante intravítreo de WJ-MSCs 175
Figura 55: Clasificación histológica de neovascularización en retina y nervio óptico después de la inducción de hipertensión ocular y trasplante intravítreo de WJ-MSCs..... 175
Figura 56: Ojo experimental de los animales sometidos al estudio 271
Figura 57: Valores de PIO, medidas con el Tono-Pen Avian® en los ojos de los animales 271
Figura 58: Gráfico demostrando el aumento de la PIO en el grupo experimental en un periodo de 4 semanas. 272
Figura 59: Estudio histopatológico nervio ótico del conejo..... 273
Figura 60: Estudio histopatológico retina del conejo 274
Figura 61: Estudio histopatológico del ángulo de drenaje del conejo..... 275
Figura 62: Evaluación Respuesta Pupilar Fotocromática 279
Figura 63: Gráficos BloxPlot demostrando medidas de latencia de onda en los ojos experimentales, a lo largo del experimento 280
Figura 64: Gráficos BloxPlot demostrando medidas de amplitud de onda en los ojos experimentales, a lo largo del experimento 280
Figura 65: Latencia después de la inducción de hipertensión ocular y trasplante intravítreo de WJ-MSCs..... 281
Figura 66: Amplitud de onda después de la inducción de hipertensión ocular y trasplante intravítreo de WJ-MSCs..... 280
Figura 67: Respuesta pupilar fotocromática: Medidas del diámetro pupilar post estímulo con luz azul observados en el modelo de hipertensión ocular y *post* trasplante intravítreo de WJ-MSCs..... 281

Figura 68: Inmunohistoquímica: Inmunomarcación positiva para células $TCD3^+$ 282
Figura 69: Inmunohistoquímica: Inmunomarcación positiva para células $TCD3^+/TCD4^+$ 283
Figura 70: Inmunohistoquímica: Inmunomarcación positiva para células $TCD3^+/TCD8^+$ 284
Figura 71: Inmunohistoquímica: Inmunomarcación positiva para expresión de GFAP..... 285

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Diferenciación celular las MSCs en distintos microambientes 71
Tabla 2: Signos indicativos de dolor en conejo 84
Tabla 3: Escala del dolor 84
Tabla 4: Manejo del dolor 84
Tabla 5: Kits comerciales utilizados para realizar las técnicas de ELISA 112
Tabla 6: Anticuerpos primarios y secundarios 116
Tabla 7: Estadística descriptiva observada en los grupos de investigación 148
Tabla 8: Criterios utilizados para la definición de cambios histológicos en retina y nervio óptico..168
Tabla 9: Análisis de correlación de luz azul con amplitud y latencia entre los grupos del estudio..281

DIVULGACIÓN CIENTÍFICA

Los resultados de este trabajo han sido publicados y presentados en diversos congresos científicos nacionales e internacionales.

- **Publicaciones**

Evangelho, K., Mastronardi, C. A., & De-La-Torre, A. (2019). Experimental models of glaucoma: A powerful translational tool for the future development of new therapies for glaucoma in humans—A review of the literature. Medicina, 55(6), 280. Factor impacto SCimago: 2.948. Ha sido citado en 43 artículos en revistas indexadas.

Karine dos Santos Evangelho; Carlos Cifuentes-González; William Rojas-Carabali; Clemencia De Vivero-Arciniegas; Carlos Téllez-Conti; Mariana Cañas-Arboleda; Gustavo Salguero; Carolina Ramírez-Santana; Alejandra de-la-Torre. (2024). Early Detection of Functional Changes in an Intraocular Hypertension Rabbit Model Treated with Human Wharton Jelly Mesenchymal Stem Cells Using Chromatic Pupillometry. Pakistan Veterinary Journal. PVJ:23-240. Q1, percentil Scopus 77%. Factor impacto SCimago: 1.803.

Karine dos Santos Evangelho; Carlos Cifuentes-González; William Rojas-Carabali; Clemencia De Vivero-Arciniegas; Mariana Cañas-Arboleda; Gustavo Salguero; Carolina Ramírez-Santana; Alejandra de-la-Torre. (2024). Early detection of optic nerve head changes by optical coherence tomography after using mesenchymal stromal cells as intravitreal therapy in ocular hypertension rabbit models. Veterinary World. VETWORLD-2023-08-394. Q1, percentil Scopus 80%. Factor impacto: 1.6.

Karine dos Santos Evangelho; Carlos Cifuentes-González; William Rojas-Carabali; Clemencia De Vivero-Arciniegas; Mariana Cañas-Arboleda; Gustavo Salguero; Carolina Ramírez-Santana; Alejandra de-la-Torre. (2024). Mesenchymal stromal cells from human Wharton's jelly modulate the intraocular immune response in a glucocorticoid hypertension model: an exploratory analysis. Ophthalmic Research. Q2, percentil Scopus 79%. Factor impacto: 2.1.

- **Congresos Científicos Nacionales**

- **Póster Ganador 1er Lugar del Concurso en el Congreso de Especialidades VEPA 2019 / Cali – Colombia. "Estudio preliminar de un nuevo modelo experimental *in vivo* de HO inducido por glucocorticoides".** Congreso Vepa Colombia 2019, que se realizó en la ciudad de Cali los días 31 de mayo, 1 y 2 de junio.
- "**Análisis de los niveles de citoquinas en el humor acuoso y vitreo en un modelo de HO corticoideo**." CVDC Congreso Veterinario de Colombia y Congreso Veterinario de León 2022, que se realizó en la ciudad de Pereira los días 3, 4 y 5 de agosto.
- **Póster Ganador 2° Lugar del Concurso "Efecto de la aplicación de las MSCs de gelatina de Wharton en los diferentes niveles de citoquinas en un modelo de HO corticoideo."** CVDC Congreso Veterinario de Colombia y Congreso Veterinario de León 2022, que se realizó en la ciudad de Pereira los días 3,4 y 5 de agosto.
- **"Evaluación de los cambios en la retina mediante tomografía de coherencia óptica y retinografía en un modelo experimental de HO post aplicación de MSCs de gelatina de Wharton."** CVDC Congreso Veterinario de Colombia y Congreso Veterinario de León 2022, que se realizó en la ciudad de Pereira los días 3, 4 y 5 de agosto.
- **"Sistema de puntuación histológico en un modelo experimental de HOpost aplicación de las MSCs de gelatina de Wharton."** CVDC Congreso Veterinario de Colombia y Congreso Veterinario de León 2022, que se realizó en la ciudad de Pereira los días 3, 4 y 5 de agosto.
- **"Cambios estructurales y funcionales de la retina post aplicación de células estromales, mesenquimales y un modelo de HO inducido por glucocorticoides**." Congreso Vepa Colombia 2022, que se realizó en la ciudad de Cartagena de Indias los días 27, 28 y 29 de julio.

➢ Congresos Científicos Internacionales

- **"Efecto de la aplicación de las MSCs de gelatina de Wharton en el microambiente ocular en un modelo de HO corticoideo"** en el II Congreso Panamericano de Trauma Ocular y el Curso Internacional de la Sociedad Ecuatoriana de Glaucoma, evento científico realizado en la ciudad de Cuenca Ecuador, los días 26, 27 y 28 de enero de 2023.
- **"Efecto de la aplicación intravítrea de MSCs en la respuesta inflamatoria intraocular en un modelo experimental de** HO**"** en el Xl Congreso Latinoamericano de Oftalmología Veterinaria CLOVE, evento científico realizado en la ciudad de Lima, Perú en los días 21 al 24 de mayo de 2023.

- **“Cambios morfológicos y funcionales en la retina y el disco óptico post la aplicación de MSCs intravítreas en un modelo de HO”** en el Xl Congreso Latinoamericano de Oftalmología Veterinaria CLOVE, evento científico realizado en la ciudad de Lima, Perú en los días 21 al 24 de mayo de 2023.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 MEDIOS TRANSPARENTES DEL OJO: HUMOR ACUOSO Y HUMOR VÍTREO

1.1.1 Humor Acuoso: Composición y Funciones

El humor acuoso, un líquido transparente presente tanto en la cámara anterior como en la posterior del ojo, desempeña múltiples funciones vitales. Además de mantener el equilibrio metabólico ocular y facilitar el suministro de oxígeno y nutrientes a las estructuras carentes de vasos sanguíneos, contribuye a la eliminación de desechos metabólicos (1). También actúa como un vehículo no específico para citoquinas e inmunoglobulinas (2), y está compuesto principalmente por electrolitos, carbohidratos, glutatión, urea, aminoácidos, proteínas, oxígeno, dióxido de carbono y agua (3) y mayor concentración de ácido ascórbico, lactato y el ion cloruro (4). Adicionalmente, contiene hormonas sexuales esteroideas, enzimas como la anhidrasa carbónica y la lisozima, citoquinas como el TGF-β, y bajos niveles de neurotransmisores como la adrenalina, noradrenalina y dopamina(5).

El humor acuoso, formado en los procesos ciliares en la cámara posterior, atraviesa la pupila hasta llegar a la cámara anterior, donde es evacuado a través del sistema de drenaje. La mayor parte del humor acuoso es drenada mediante mecanismos de flujo pasivo a través de la cámara anterior, por medio de una red de vénulas libres de sangre conocidas como plexo angular acuoso. El drenaje ocurre a través de dos vías: la vía convencional, también llamada vía trabecular, y la vía uveoescleral (ver Figura 1) (6). La secreción del humor acuoso y la regulación de su flujo son procesos cruciales para el correcto funcionamiento del globo ocular. Su producción y eliminación están en constante equilibrio, de manera que cualquier alteración en la eliminación puede producir un aumento de la presión intraocular (PIO), el principal factor de riesgo en la patogénesis y progresión del glaucoma (7).

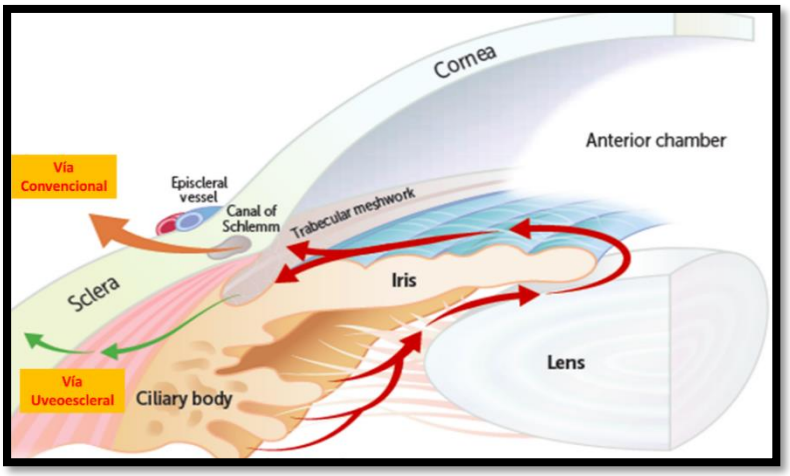


Figura 1: Drenaje humor acuoso. Vía convencional: humor acuoso producido en el epitelio no pigmentado del cuerpo ciliar es secretado a la cámara posterior y circula hacia la cámara anterior atravesando la pupila, alcanzando la malla trabecular, canal Schlemm y sale por las venas epiesclerales. Vía uveoescleral: el humor acuoso atraviesa el espacio intersticial del músculo ciliar hacia el tejido supracoroideo y la esclera (7). ***Fuente:*** *Modificado a partir de Masscience.com. (https://www.facoelche.com/via-supracoroidea-en-glaucoma/)*

La HO puede ser de carácter primario (desequilibrio entre la producción y el drenaje del humor acuoso) o secundario (causada por otra enfermedad). Aunque la HO no se considera un proceso patológico en sí, constituye un factor de riesgo importante en el desarrollo de ciertas patologías oculares, como el glaucoma (8).

1.1.2 Humor Vítreo

El humor vítreo es una estructura esencialmente transparente y gelatinosa, de forma esférica ligeramente aplanada, que ocupa aproximadamente el 80% del volumen total del ojo, con un volumen promedio de alrededor de 4 mL, aunque esta cifra puede variar según la edad y el tamaño del ojo. Esta sustancia está compuesta por dos partes principales: el humor vítreo propiamente dicho, que es líquido y contiene agua junto con todas las sustancias hidrosolubles, y un componente adherente, aglutinado, denominado proteína residual o componente insoluble. Aunque a simple vista puede parecer una estructura homogénea, los estudios bioquímicos y biomicroscópicos revelan que el vítreo es extremadamente complejo en su composición (9), con muchas macromoléculas distribuidas de manera heterogénea y muy pocas células. Es un tejido conectivo avascular compuesto principalmente de agua (99% de su composición), ácido hialurónico, ácido siálico, ácido ascórbico y láctico, glucosa, algunos lípidos, componentes inorgánicos, albúminas, globulinas y algunos aminoácidos (10).

Los aminoácidos implicados en la patogenia de múltiples enfermedades neurodegenerativas, como el glutamato, presentan una menor concentración en el vítreo bajo condiciones normales (11). El glutamato, que actúa como un neurotransmisor excitador, puede volverse neurotóxico en el sistema nervioso central y en la retina cuando su concentración aumenta, lo que puede llevar a la muerte de las células ganglionares de la retina (CGRs) (12). Debido a la presencia de la barrera hematorretiniana, los medicamentos no alcanzan fácilmente la cavidad vítrea. Por lo tanto, las inyecciones intravítreas son una forma importante de tratamiento para diversas enfermedades. Actualmente, las inyecciones intravítreas se utilizan para tratar varias patologías de la retina, permitiendo alcanzar una mayor concentración local del medicamento con menos efectos colaterales sistémicos y un bajo riesgo de complicaciones oculares (13).

El conocimiento detallado de la anatomía del ojo es esencial para realizar correctamente las inyecciones intravítreas. La aguja debe ser insertada perpendicularmente a la esclera en la *pars plana*, a unos 4 mm del limbo corneal, con la punta dirigida hacia el nervio óptico, para evitar tocar el cristalino (ver Figura 2). Una técnica inadecuada puede causar complicaciones iatrogénicas, como cataratas y desgarros retinianos, que podrían desencadenar un desprendimiento de retina. Sin embargo, la mayoría de las complicaciones derivadas de las inyecciones intravítreas son transitorias y tratables. A pesar de los riesgos asociados, estas inyecciones siguen siendo una herramienta valiosa en el tratamiento de diversas enfermedades oculares (13).

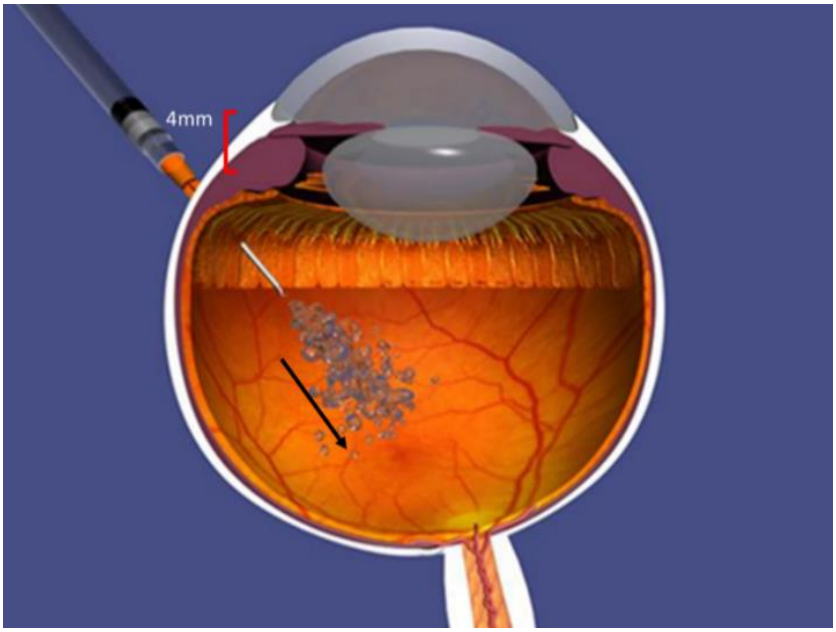


Figura 2: **Imagen aplicación substancia en humor vítreo.** Ilustración: Inserción de la aguja perpendicular en la región de *pars plana*, con salida del medicamento en vítreo. **Fuente:** *Modificado* de (14).

1.2 Retina y Nervio Óptico

La retina, una estructura crucial para la visión, es una membrana delgada y delicada que recubre la parte posterior del globo ocular, derivada embriológicamente del neuroectodermo. Se extiende desde la cabeza del nervio óptico hasta la ora serrata, donde se continúa con el epitelio no pigmentado de la pars plana del cuerpo ciliar. Limitada externamente por la coroides e internamente por el cuerpo vítreo (15), la retina se compone de 10 capas histológicas. La luz atraviesa estas capas para llegar a los conos y bastones, células especializadas en la recepción de estímulos visuales y la transformación de estas señales en impulsos nerviosos mediante la fototransducción (16). Luego, la señal se transmite a las células bipolares, que hacen sinapsis con las células ganglionares cuyos axones llevan la información al encéfalo. Las células restantes de la retina, como las horizontales, amacrinas e interplexiformes, modifican e integran la señal antes de que esta abandone el ojo (17).

Desde el punto de vista morfológico, la retina se compone de seis tipos principales de neuronas, organizadas en tres capas nucleares: externa, interna y la capa de células ganglionares. Además, hay dos capas plexiformes, donde ocurren las interacciones sinápticas entre los principales tipos de neuronas (fotorreceptores, células bipolares, células horizontales, CGRs y células amacrinas) (ver Figura 3) (17). Además de estas células, la retina alberga otros tipos celulares que conforman el tejido de soporte neuronal, como las células de Müller, astrocitos, oligodendrocitos y la microglía. Esta compleja estructura neuronal permite la captación y el procesamiento de la información visual antes de su transmisión al sistema nervioso central (18).

Una de las estructuras anatómicas cruciales en los procesos neurodegenerativos es el epitelio pigmentario de la retina (EPR), ubicado entre la retina neural y la coroides (19). Este epitelio está compuesto por una sola capa de células cúbicas pigmentadas con microvellosidades en la superficie apical, que están en contacto con los segmentos de los fotorreceptores. El EPR se encuentra sobre la membrana de Bruch, que lo separa de la coroides. Desempeña varias funciones vitales: absorbe la luz que atraviesa la retina para prevenir la reflexión y el brillo, forma parte de la barrera hematorretiniana mediante uniones estrechas entre sus células, aísla la retina de sustancias sanguíneas y previene la entrada de moléculas tóxicas y componentes del plasma en la retina. Además, participa en el transporte activo de metabolitos y en la fagocitosis de los segmentos externos de los fotorreceptores, reciclando los pigmentos visuales (19).

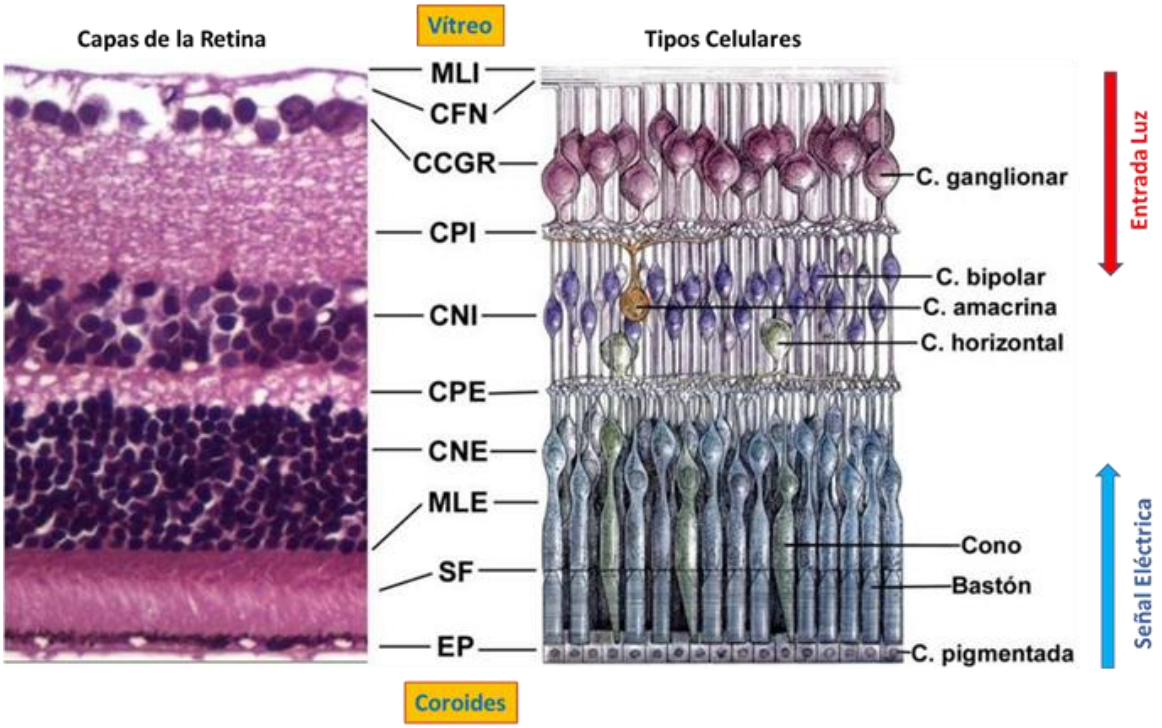


Figura 3: **Imágenes de la retina de mamífero**. Corte histológico de la retina teñido con hematoxilina-eosina y sus respectivas capas. **EP**: Epitelio Pigmentario; **SF**: Segmentos de los Fotorreceptores; **MLE**: Membrana Limitante Externa; **CNE**: Capa Nuclear Externa; **CPE**: Capa Plexiforme Externa; **CNI**: Capa Nuclear Interna; **CPI:** Capa Plexiforme Interna; **CCGRs**: Capa de las Células Ganglionares; **CFN**: Capa de las Fibras Nerviosas; **MLI:** Membrana limitante Interna. Principales tipos celulares en la retina. Transformación luz en señal nerviosa: La luz (flecha roja) penetra por la cámara vítrea y atraviesa toda la retina llegando a los fotorreceptores donde se transforma en señal eléctrica (flecha azul) que viajará por todo el espesor de la retina para transmitirse por el nervio óptico hacia los centros superiores de control visual del encéfalo. ***Fuente**: Modificada de* (20).

La retina recibe su vascularización de la coroides a través de un sistema capilar de las arterias coroideas, ramificaciones de las arterias ciliares que nutren el EPR y los fotorreceptores (21). Por otro lado, la retina interna es nutrida por vasos propios de la retina, ramas de la arteria central de la retina, que a su vez es una rama de la arteria oftálmica. Estas arterias forman dos capas capilares en la retina interna: una capa superficial en la capa de células ganglionares de la retina (CCGRs) y la capa de fibras nerviosas de la retina (CFNR) (22). La arteria cilioretiniana, presente en el 15-20% de la población, es un vaso inconstante que ingresa por el disco óptico y se origina en la vascularización coroidea, nutriendo el área macular (23). La reducción de la actividad parasimpática, como se observa en pacientes con glaucoma, puede disminuir el flujo sanguíneo coroideo, lo que provoca isquemia retiniana. Esta isquemia puede causar daño en los fotorreceptores, pérdida del campo visual y vasodilatación autorregulatoria reactiva en los vasos retinianos (24).

La papila óptica, también conocida como cabeza del nervio óptico (CNO), se encuentra medialmente a unos 3 mm de la fóvea y es redonda o levemente ovalada. Estructuralmente, no es retina propiamente dicha, ya que está compuesta por los axones de las células ganglionares en su salida del globo ocular, la membrana limitante interna y los grandes vasos centrales de la retina, como la arteria y la vena central. Los axones de las células ganglionares se curvan en un ángulo de 90° para ingresar a la papila o disco óptico (20). En esta región, no hay fotorreceptores, lo que la convierte en la mancha ciega en el campo visual. El color blanco-rosáceo de la papila se debe a la lámina cribosa de la esclera y la red de capilares que la atraviesa (23). Normalmente, la papila tiene una forma redondeada o ligeramente ovalada y presenta una excavación fisiológica que suele ser menor al 40% de su tamaño (20). Un aumento en la excavación del nervio por encima de este porcentaje puede ser indicativo de glaucoma (25).

- **Tipos celulares en la retina**

- ***Neuronas***

a) **Fotorreceptores:** Existen dos tipos de fotorreceptores: los bastones y los conos. Los bastones son responsables de la visión en condiciones escotópicas (baja luminosidad) y contienen el pigmento visual rodopsina. Sus segmentos externos son estructuras delgadas con forma de bastón. Los segmentos internos y externos de los bastones alcanzan el epitelio pigmentario (EP), y sus cuerpos celulares se sitúan en la capa nuclear externa, por debajo de los somas de los conos (22,23). Los conos, por su parte, se encargan de la visión en condiciones fotópicas (alta luminosidad) y contribuyen a la visión cromática. Esto se debe a que están compuestos de diferentes opsinas, que presentan su máxima sensibilidad en diversas zonas del espectro electromagnético. Estos conos de diferentes "colores" están conectados a células bipolares, horizontales y ganglionares específicas para ese "color". Su segmento externo tiene forma cónica y están situados en una fila de somas justo por debajo de la membrana limitante externa (22).

b) **Células horizontales**: Estas neuronas interconectan con otras células en la capa plexiforme externa, y su soma se encuentra en la capa nuclear interna (22). Forman sinapsis recíprocas con los fotorreceptores, contribuyendo a la sumación espacial de los estímulos y organizando la estructura centro/periferia de los campos receptores de las células ganglionares (23).

c) **Células bipolares**: Las células bipolares son las encargadas de transmitir la señal desde la capa plexiforme externa, donde hacen sinapsis con los fotorreceptores, hasta la capa plexiforme

interna, donde conectan con las células ganglionares de la retina (CGRs) y amacrinas (22). Su cuerpo celular se encuentra en la capa nuclear interna. Existe una clara diferenciación entre las células bipolares para bastones, de las que solo se conoce un subtipo, y las células bipolares para conos, que se subdividen en 8 o 10 subtipos dependiendo del patrón de ramificación de sus dendritas (26).

d) **Células amacrinas**: Las células amacrinas son neuronas que poseen una gran cantidad de dendritas, pero carecen de axón. Sin embargo, presentan largos procesos que pueden actuar como verdaderos axones, aunque estos permanecen siempre dentro de la retina (23). Su cuerpo celular está situado en la capa nuclear interna, y sus prolongaciones se extienden por la capa plexiforme interna. Las terminaciones dendríticas de las células amacrinas hacen sinapsis con otras células amacrinas, con los axones de las células bipolares y establecen conexiones con las CGRs, retroalimentando también a las células bipolares (22).

e) **Células interplexiformes:** Estas neuronas de asociación tienen su cuerpo celular en la capa nuclear interna, y sus terminaciones sinápticas se extienden por ambas capas plexiformes. En la capa plexiforme interna, reciben aferencias de las células amacrinas y hacen sinapsis con algunos axones de células bipolares de cono y de bastón (22,23).

f) **Células ganglionares**: Las células ganglionares poseen un soma voluminoso y ramificaciones dendríticas que forman sinapsis en la capa plexiforme interna con las terminaciones de las células bipolares y amacrinas. Sus axones forman la capa de fibras nerviosas de la retina (CFNR) y solo se mielinizan en el nervio óptico, ya fuera del globo ocular. Estos axones se extienden hasta el cuerpo geniculado lateral, donde ocurre la siguiente sinapsis en la vía visual, siendo las únicas células de proyección de la retina (23)**.**

- ***Células gliales***

En una retina sana, las células microgliales se encuentran en un estado de "reposo", en el cual liberan factores neurotróficos que favorecen la supervivencia neuronal. Las células gliales son responsables del mantenimiento de la homeostasis del tejido, además de contribuir a la supervivencia neuronal. Sin embargo, en los procesos neurodegenerativos, la microglía se activa, iniciando un proceso de reparación. En casos crónicos como el glaucoma, la microglía puede desencadenar una inflamación crónica debido a la secreción de sustancias que provocan daño en la retina y apoptosis neuronal (27,28).

a) **Células de Müller**: Estas células proporcionan un soporte estructural a la retina de manera radial, atravesando todas sus capas y rodeando al resto de las neuronas. Su núcleo se localiza en la capa nuclear interna. La membrana limitante externa, formada por uniones adherentes entre las células de Müller y los segmentos internos de los fotorreceptores, constituye una barrera entre el espacio subretiniano y la retina neural. Por su parte, la membrana limitante interna actúa como barrera de difusión entre la retina y el humor vítreo. Las células de Müller tienen funciones esenciales para la viabilidad y supervivencia neuronal de la retina, como el almacenamiento de glucógeno, el suministro de glucosa a las neuronas, el mantenimiento de la homeostasis y el equilibrio iónico, y el reciclaje de aminoácidos liberados en las sinapsis (23). Además, desempeñan un papel clave en la protección frente a estímulos patogénicos. Cuando se vuelven reactivas, pueden ejercer tanto efectos neurotóxicos como protectores sobre los fotorreceptores mediante la liberación de factores antioxidantes y neurotróficos (28).
b) **Astrocitos:** Los astrocitos son fundamentales para el mantenimiento de la homeostasis celular en el tejido retiniano (28). Se localizan en la capa de fibras nerviosas de la retina (CFNR) y se caracterizan por su cuerpo celular aplanado y una serie de procesos radiales llenos de filamentos intermedios. Su morfología varía según su localización, siendo muy elongados en la retina central y adoptando una forma estrellada en la retina periférica (19). Los astrocitos forman tubos gliales a través de los cuales discurren los axones de las células ganglionares, interactuando con vasos sanguíneos, neuronas y otros astrocitos vecinos mediante uniones comunicantes (*gap junctions*) (28). Además, son responsables de proporcionar soporte estructural y metabólico a la retina y participan en la detoxificación durante el proceso de envejecimiento (19). Este tipo celular también se ha descrito en la retina de conejos, donde se alinean con los axones de las CGRs y, en algunos casos, están en contacto con los capilares (29).
c) **Células microgliales**: La microglía está compuesta por células inmunes innatas que participan en la vigilancia inmunológica dentro del sistema nervioso central, incluida la retina (30). Estas células penetran en la retina coincidiendo con los precursores de los vasos sanguíneos durante las primeras etapas del desarrollo embrionario. La microglía puede encontrarse en cualquier nivel de la retina, aunque principalmente se localiza en la capa nuclear externa, capa plexiforme externa, capa nuclear interna y capa plexiforme interna. Son células multipolares, con pequeños cuerpos celulares y procesos irregulares y cortos. La microglía puede encontrarse en un estado de reposo o en estado reactivo en respuesta a una lesión, y tiene la capacidad de fagocitar (31,32).

1.3 GLAUCOMA

El glaucoma es una enfermedad neuropática progresiva caracterizada por cambios en el nervio óptico y la presencia de defectos asociados en el campo visual (33). Actualmente, cerca de 4,5 millones de personas en todo el mundo han perdido la visión debido al glaucoma, lo que representa aproximadamente el 12% de la carga total de ceguera a nivel mundial. En Colombia, se estima que alrededor de un millón de personas padecen glaucoma, y de ellas, unas 40.000 han perdido la visión por esta causa. Estudios han demostrado que, en las mujeres colombianas mayores de 30 años, el glaucoma ocupa el tercer lugar entre los principales problemas de salud (34). El glaucoma surge como resultado de una interacción compleja entre factores genéticos y ambientales.

El proceso de envejecimiento celular, caracterizado por la acumulación de daño oxidativo a lo largo de la vida, puede desencadenar apoptosis neuronal y déficits funcionales asociados con la edad, contribuyendo así a la pérdida de la función visual en la población adulta mayor (35). A nivel ocular, se observan cambios tanto cuantitativos como cualitativos en las estructuras de colágeno y en la matriz extracelular, lo que genera un entorno más rígido que puede afectar el flujo del humor acuoso (36). La rigidez ocular tiende a aumentar con la edad (37), lo que puede elevar la PIO al disminuir el flujo de drenaje del humor acuoso (38).

La literatura científica ha documentado que las personas con hipertensión y PIO elevada, especialmente cuando se asocian con el envejecimiento, tienen un mayor riesgo de desarrollar Glaucoma Primario de Ángulo Abierto (GPAA) (12). Aunque se ha establecido una relación entre la edad y el riesgo de glaucoma, algunos estudios no han mostrado cambios significativos en la PIO con la edad (39). Sin embargo, es importante destacar que la mayoría de los estudios experimentales que inducen glaucoma en modelos animales utilizan animales jóvenes, lo que puede sesgar los resultados y dificultar la comprensión de la enfermedad en el contexto del envejecimiento humano (40). La falta de estudios experimentales que comparen los resultados de la inducción de glaucoma en animales de mediana edad y mayores ha generado inconsistencias en los hallazgos, lo que subraya la necesidad de investigaciones más exhaustivas en este campo para mejorar la comprensión del glaucoma y su relación con el envejecimiento (39).

- ***Teorías de la Neuropatía Glaucomatosa***

Estudios recientes han confirmado la importancia de la PIO en la progresión del glaucoma, pero la relación causal exacta entre la PIO y la neuropatía óptica sensible a la presión sigue siendo inconclusa (41). Actualmente, existen varias teorías que intentan explicar la pérdida de las Células Ganglionares de la Retina (CGRs) en los pacientes con glaucoma, destacándose las teorías vasculares (indirecta) y mecánicas (directa). Sin embargo, estas teorías no son independientes ni excluyentes entre sí, ya que el glaucoma es una patología multifactorial (42). En la *teoría vascular*, se considera que la cabeza del nervio óptico (CNO) experimenta una lesión isquémica crónica debido al aumento de la PIO, lo que lleva a la compresión de los capilares que nutren la capa superficial del nervio óptico. El daño glaucomatoso temprano muestra, histológicamente, una compactación y fusión de las capas de la lámina cribosa, además de pérdida de axones, células gliales y vasos capilares (43).

En la *teoría mecánica*, se postula que existe una lesión relacionada con la presión en los axones que pasan por la lámina cribosa, a nivel del nervio óptico, y que es particularmente susceptible al estrés mecánico desencadenado por el aumento de la PIO (42). Esta compresión de las fibras nerviosas del nervio óptico impide el libre movimiento de sustancias desde el cuerpo celular hasta las dendritas. En el glaucoma, ocurre una alteración en el movimiento del flujo axoplásmico desde el cuerpo geniculado externo hacia la retina, produciendo una reducción en la distribución de neurotrofinas, como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y el factor de crecimiento fibroblástico básico (BFGF) (44). Como resultado, los cuerpos de las CGRs sufren la falta de apoyo trófico, mientras que los axones se ven afectados por la presión (ver Figura 4) (42).

Además, la literatura reporta una sobreexpresión del factor de crecimiento transformante beta (TGF-β), el cual produce fibrosis en la malla trabecular (MT), impidiendo el drenaje del humor acuoso, lo que incrementa la PIO y provoca la muerte de las CGRs (45). El patrón y la progresión de la pérdida del campo visual debido a la muerte de las CGRs varían entre los pacientes con glaucoma, lo que sugiere cierta variabilidad en la magnitud del mecanismo responsable de la pérdida celular. En modelos experimentales de glaucoma, se ha observado que no todas las CGRs mueren al mismo tiempo (46). Además, la estimación de la muerte de las CGRs es proporcional a la magnitud del daño producido (47).

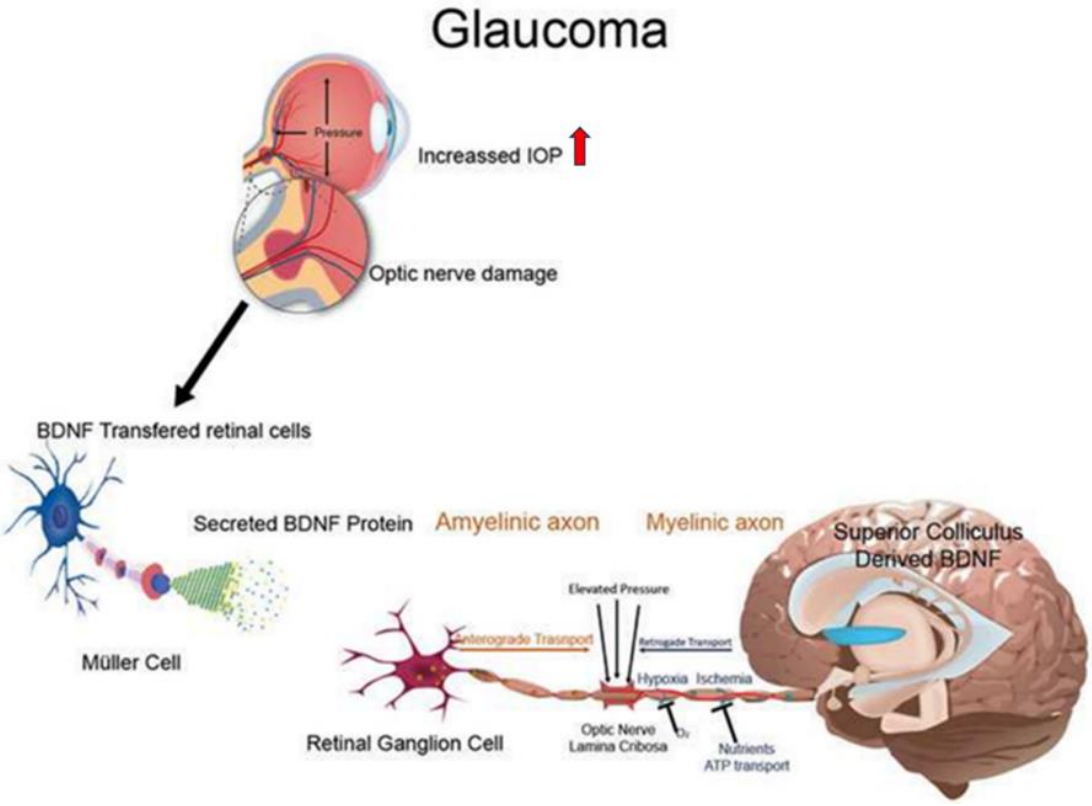


Figura 4: **Teorías de la neuropatía glaucomatosa**. El aumento de la PIO provoca daños en la cabeza del nervio óptico. El aumento de la presión en la lámina cribosa del nervio óptico desencadena una alteración en la obstrucción coroidea, anterógrada y retrógrada del transporte axonal en la cabeza del nervio óptico, donde los axones salen del ojo. Esto reduce la transmisión de señales tróficas como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BNDF) y el factor de crecimiento nervioso (NGF) de los axones terminales a los cuerpos de las células neuronales, así como el transporte de nutrientes y oxígeno a las capas de la retina, que producen hipoxia e isquemia. Los axones de las CGRs no mielinizados son altamente dependientes de energía, que se correlaciona con un alto número de mitocondrias en este segmento del nervio óptico. Los cambios en el suministro de energía causan una alteración en el flujo axoplásmico desde el núcleo geniculado lateral y el colículo superior a las CGRs, lo que contribuye a la reducción de las neurotrofinas y el daño del axón**. CGRs:** células ganglionares de la retina**.** ***Fuente****: Modificado de* (48)*.*

A. <u>Excitotoxicidad mediada por el glutamato</u>: La excitotoxicidad se refiere al proceso patológico por el cual las neuronas se dañan debido al aumento de las concentraciones de calcio intracelular en respuesta a una sobreestimulación de los receptores de glutamato. El efecto dañino del glutamato en la retina ha sido bien caracterizado. Estudios han demostrado que inyecciones subcutáneas de glutamato conducen a una destrucción severa de las capas internas de la retina, especialmente de la capa de células ganglionares de la retina (CCGRs) (49). En el glaucoma, la lesión inicial de las CGRs conduce a niveles elevados de glutamato extracelular y un flujo de salida anormal de glutamato, lo que puede jugar un papel crucial en el desencadenamiento de procesos celulares que conducen a la muerte neuronal por excitotoxicidad. Como consecuencia del aumento de los

niveles de glutamato, los receptores ionotrópicos de N-methyl-D-aspartate (NMDA) se sobreestimulan, resultando en una masiva afluencia de calcio en las neuronas (101).

El calcio activa enzimas catabólicas, fosfolipasas, superóxidos, radicales libres y cinasas, lo que causa una mayor liberación de ácido glutámico adicional. De esta manera, en el glaucoma se establece un círculo vicioso que permite la autodestrucción celular a través de una neurotoxicidad crónica, culminando en una muerte celular acentuada por la interrupción de la homeostasis del calcio (42). El aumento de la PIO intensifica la entrada de calcio extracelular en las CGRs. El calcio activa la calpaína, una cisteína proteasa que escinde la calcineurina (50). La calcineurina desencadena la apoptosis en las CGRs a través de la desfosforilación de la proteína proapoptótica BAD e induce la muerte celular al estimular la liberación de citocromo c desde la mitocondria (51).

B. <u>Daño por estrés oxidativo</u>: El aumento intracelular de calcio, además de causar cambios en la membrana, también estimula la activación de la enzima sintetasa de óxido nítrico dependiente de calmodulina. La entrada masiva de calcio a la mitocondria provoca la formación de un poro de transición en la membrana mitocondrial interna, lo que lleva a un colapso en el potencial electroquímico de protones, disminuyendo los niveles de ATP y aumentando las especies reactivas de oxígeno (ROS). El déficit de ATP impide el funcionamiento de las bombas dependientes de ATP en la membrana citoplasmática, lo que provoca una entrada masiva de agua y Na+ y una salida de K+, causando edema celular o muerte por necrosis.

El daño mitocondrial y al DNA induce la activación de genes que conducen a la apoptosis (52). A medida que las células mueren, se liberan sustancias neurotóxicas que pueden desencadenar apoptosis en células previamente no afectadas. Por lo tanto, cualquier daño puede propagarse más allá de su extensión original por degeneración secundaria (42). En condiciones normales, los radicales superóxidos son eliminados por los antioxidantes presentes en el globo ocular. Sin embargo, numerosos estudios han revelado que en pacientes con glaucoma hay una disminución en los niveles de defensas antioxidantes (53). Además, las ROS pueden reaccionar con el óxido nítrico produciendo peroxinitritos, una sustancia altamente reactiva y neurotóxica (54).

1.3.1 Clasificación del glaucoma

Los diferentes tipos de glaucoma se pueden clasificar en función de varios parámetros. Entre ellos se encuentran: a) Glaucoma primario: En este tipo de glaucoma, la elevación de la PIO no está asociada a otras enfermedades sistémicas u oculares que aumenten la resistencia al flujo de

salida del humor acuoso. En este caso, la elevación de la PIO ocurre debido a una alteración directa de las estructuras involucradas en el drenaje del humor acuoso (55) o que favorezcan el cierre angular, y suelen afectar a ambos ojos (56); b) Glaucoma secundario: Este tipo de glaucoma es secundario a trastornos oculares o sistémicos que alteran el drenaje del humor acuoso. Puede clasificarse en función del mecanismo que afecta dicho drenaje: glaucoma de ángulo abierto (el ángulo iridocorneal está abierto) o cerrado (el ángulo de la cámara anterior es muy estrecho o está completamente cerrado). En el glaucoma de ángulo cerrado, la salida del humor acuoso está bloqueada por la raíz del iris, que se encuentra posicionada sobre la MT (57,58).

- **Glaucoma de Ángulo Abierto**

La HO es el factor de riesgo más importante asociado al desarrollo o a la progresión del glaucoma, aunque no es el único, ya que no todos los glaucomas están asociados al aumento de la PIO (59). La HO es consecuencia de un desbalance entre la producción y el drenaje del humor acuoso, normalmente debido a una perturbación en el drenaje. En pacientes normales, la PIO oscila entre 11 y 21 mmHg, con una media de 15 mmHg (60). Por lo tanto, se define HO como aquella situación clínica en la que los valores de PIO son mayores que el límite superior de la normalidad (57,61). Para calificar una PIO como patológica es necesario realizar varias mediciones, ya que la PIO normal fluctúa a lo largo del día en un rango de 5 mmHg y se ve influenciada por factores como el latido cardíaco, la presión arterial y la respiración (60).

De las personas que presentan HO, un porcentaje desarrollará glaucoma de ángulo abierto en un período de 5 a 15 años (62,63). os pacientes con glaucoma de ángulo abierto suelen ser asintomáticos hasta que se produce una pérdida significativa del campo visual, que en el momento del examen puede haber evolucionado hacia una fase moderada o grave. Esto se debe a que las modificaciones campimetrías evolucionan lentamente y de forma centrípeta, lo que hace que la visión central no se vea afectada hasta los estadios finales de la enfermedad (60). Existen algunos factores que aumentan el riesgo de progresión de HO a glaucoma de ángulo abierto, como un espesor corneal igual o menor a 555 µm, ascendencia africana, edad avanzada, antecedentes familiares de glaucoma, aumento de la relación excavación/papila vertical, signos de dispersión pigmentaria o pseudoexfoliación, o la presencia de alteraciones oculares o sistémicas que incrementan el riesgo de desarrollar daño glaucomatoso (57).

Actualmente, numerosos trabajos de investigación relacionan la patogénesis del glaucoma con un incremento en la síntesis de los componentes de la matriz extracelular de la MT y del músculo

ciliar. La literatura también subraya que el aumento de la PIO provoca cambios en la expresión de ciertos genes, lo que da lugar a la acumulación de sustancias como la IL-6, implicadas en la permeabilidad vascular, remodelación de la matriz extracelular, reorganización del citoesqueleto y eliminación de radicales libres (20,64,65). Además, los pacientes con glaucoma primario de ángulo abierto (GPAA) presentan un canal de Schlemm con menor densidad de poros y dimensiones más reducidas en comparación con individuos normales (20,66).

- **Glaucoma de Ángulo Abierto Inducido por Corticosteroides**

Debido a sus propiedades antiinflamatorias y anti angiogénicas, los corticosteroides se han convertido en un tratamiento ampliamente utilizado en la práctica oftalmológica para abordar una variedad de trastornos inflamatorios. Sin embargo, uno de los principales efectos adversos asociados con el uso de corticosteroides oculares es el desarrollo de HO, un evento que ocurre de manera dependiente de la dosis e independientemente de la vía de administración (67). Es importante destacar que no todos los individuos responden de la misma manera a la terapia con glucocorticoides (GCs) (68). Aproximadamente el 40% de las personas desarrollan una elevación de la PIO (aumento de más de 6 mmHg respecto a la PIO basal del individuo, o PIO > 21 mmHg) después de la administración tópica de corticosteroides durante un período prolongado. Esta elevación de la PIO puede indicar una predisposición a la enfermedad (69). Por otro lado, casi todos los pacientes con GPAA muestran una respuesta de elevación de la PIO ante los esteroides (70).

La HO inducida por corticosteroides comparte similitudes con el GPAA en términos de la morfología del ángulo de la cámara anterior y la disminución del drenaje del humor acuoso a través de la vía convencional (71). Estas similitudes proporcionan una base morfológica y molecular que ayuda a comprender mejor la patogénesis del glaucoma (72). En este sentido, el modelo de glaucoma inducido por esteroides sirve como una herramienta útil para estudiar la disfunción del sistema de drenaje del humor acuoso y mejorar nuestra comprensión de la enfermedad glaucomatosa en general (71,73). Para comprender los procesos que subyacen a la HO inducida por GCs, se han desarrollado modelos animales en varias especies (74). Esta investigación, se centró en el conejo, que presenta varias ventajas sobre otras especies para el estudio de la HO, como ya se ha descrito.

Varios estudios en conejos han respaldado la idea de un acúmulo anormal de mucopolisacáridos ácidos en el ángulo de la cámara, afectados por los esteroides tópicos. Aunque el mecanismo exacto de esta acumulación no está claro, se sugiere que podría estar relacionado con

la inhibición de lisosomas responsables de la degradación de complejos proteicos y mucopolisacáridos. Un metabolismo anormal en los lisosomas podría conducir al aumento de la PIO (73,75). En estudios en ratones, se ha observado un aumento de glucosaminoglicanos en la matriz extracelular del tejido conectivo juxtacanalicular, así como un mayor grosor del material de la vaina que rodea las fibras de la trabécula, lo que contribuye a la elevación de la PIO (73). En humanos, se ha descrito que la elevación de la PIO inducida por GCs está asociada con la presencia de ciertas mutaciones en el gen que codifica para la miocilina, lo que puede provocar un aumento en la acumulación de proteínas en la matriz extracelular, disminuir la actividad de la metaloproteinasa, reducir la actividad fagocítica y aumentar el estrés del retículo endoplásmico en la MT (68). Sin embargo, no se han determinado los mecanismos moleculares exactos por los cuales los GCs inducen la acumulación en estas estructuras (76).

Se ha observado que la producción de HO por esteroides varía según la edad del animal, lo que coincide con las observaciones clínicas en humanos. La aplicación tópica de dexametasona ha demostrado aumentar la PIO en conejos jóvenes (un aumento de 5 mmHg o más en el 76% de los animales estudiados), pero este efecto no se ha observado en conejos mayores (74,77). En conejos jóvenes, es posible observar alteraciones en la salida del humor acuoso debido a la inmadurez del ángulo iridocorneal, particularidades que también se observan en pacientes jóvenes. Además, los conejos jóvenes tienen una mayor capacidad de respuesta a los esteroides, posiblemente debido a un aumento en la permeabilidad de la córnea (78). El papel del sistema inmunológico en el ojo en el contexto de la HO inducida por esteroides es un tema aún sin resolver en la literatura. Aunque existen estudios que han investigado el mecanismo neurodegenerativo del glaucoma en modelos animales de glaucoma autoinmune (79), aún no se han realizado investigaciones que aborden las alteraciones inmunológicas específicas en modelos animales de glaucoma inducido por esteroides.

1.3.2 Diagnóstico del Glaucoma

Los pacientes con glaucoma crónico no suelen experimentar síntomas hasta que no existe un defecto severo en la capa de fibras nerviosas de la retina (CFNR). Por esta razón, el glaucoma es una patología que, en muchos casos, se detecta de forma casual durante exploraciones oftalmológicas rutinarias. En estos pacientes, la PIO puede superar los 40 mmHg sin manifestar ningún síntoma, ya que la visión central suele estar conservada y el aumento progresivo de la PIO no suele provocar dolor. La medición de la PIO sigue siendo el método más accesible y estudiado para diagnosticar

glaucoma, ya que no existe ninguna prueba diagnóstica, sola o en combinación, con sensibilidad y especificidad ideales para aplicarse a toda la población (80).

En casos de sospecha de glaucoma, se debe realizar una exploración completa del segmento anterior del ojo para evaluar signos asociados, además de medir la PIO y examinar el fondo de ojo bajo dilatación pupilar (80). Actualmente, el diagnóstico del glaucoma se realiza mediante la combinación de varias técnicas:

- **Tonometría**: La medición de la PIO con tonómetros se basa en la relación existente entre la PIO y la fuerza necesaria para deformar la forma natural de la córnea hasta un punto determinado. La PIO elevada es el principal factor de riesgo en el glaucoma (81). Algunos ensayos clínicos aleatorizados han mostrado que la reducción de la PIO disminuye el riesgo de aparición y progresión del glaucoma (41,62). Por esta razón, es crucial cuantificar la PIO tanto para el diagnóstico como para el seguimiento. Se considera que los pacientes cuya PIO supera repetidamente los 21 mmHg tienen un mayor riesgo que el resto de la población de desarrollar glaucoma. No obstante, esto no significa que personas con PIO por debajo de este valor no puedan desarrollar una neuropatía óptica glaucomatosa, por lo que se requieren otros parámetros para realizar el diagnóstico de la enfermedad (80). En este estudio, se realizará la medición de la PIO en un modelo experimental con el fin de investigar la inducción de HO y observar los cambios que se producen en la especie estudiada.
- **Fundoscopia**: Es un examen de la parte posterior del ojo (fondo), que incluye la retina, el disco óptico, la coroides y los vasos sanguíneos. Existen diferentes tipos de oftalmoscopia: a) *Oftalmoscopia directa*: Se utiliza para observar las estructuras internas del globo ocular sin invertir la imagen, evaluando el estado de salud visual del paciente. Además, permite observar minuciosamente las alteraciones de las estructuras internas del ojo gracias a su magnificación de aproximadamente 15 aumentos. Es un sistema fácil de usar, práctico, ligero y de fácil manejo (82); b) *Oftalmoscopia indirecta:* Proyecta una imagen real invertida entre el paciente y el observador. Muestra imágenes con mayor precisión, aunque requiere una curva de aprendizaje. La evaluación de la papila óptica, idealmente con magnificación y una visión estereoscópica con lente indirecta, es un valioso método para el diagnóstico precoz del glaucoma, debido a los cambios en la apariencia del nervio óptico antes de que se produzca pérdida del campo visual (83).

  Los pacientes con glaucoma pueden presentar algunas alteraciones visibles como aumento en la excavación del nervio óptico (círculo levemente alargado en sentido vertical con

una depresión central), presencia de hemorragias, papila pálida, fosetas o muescas del rodete neural, adelgazamiento del rodete neurosensorial (tejido entre el borde de la excavación y el borde papilar), atrofia peri papilar, irregularidad en la apariencia de los poros de la lámina cribosa, y angulaciones bruscas en el trayecto de los vasos sanguíneos que salen del área (conocidos como "vasos en bayoneta") (ver Figura 5) (84,85).

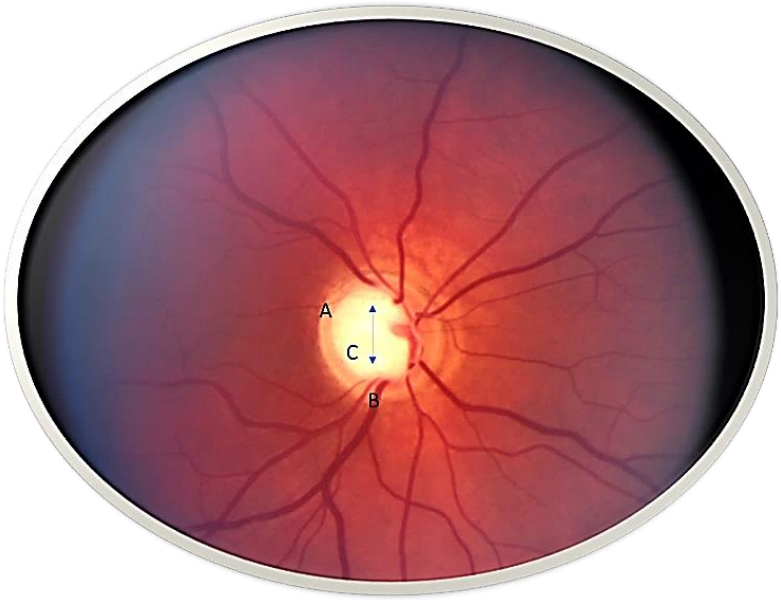


Figura 5: Imagen fondo de ojo paciente humano. Imagen con signos de glaucoma: **A)** Adelgazamiento del reborde neuro retiniano; **B)** Vasos en bayoneta; **C)** Palidez de la papila y excavación del nervio óptico con elongación vertical de la copa. ***Fuente**: Modificado* de (85).

- **<u>Tomografía de Coherencia Óptica (TCO)</u>**: Para valorar el espesor completo de la retina y del nervio óptico, se emplea la tecnología de interferometría de baja coherencia para obtener imágenes de cortes transversales de los tejidos oculares, también conocida como OCT. Este dispositivo está compuesto por un interferómetro y un láser diodo hiperluminiscente, que proyecta un haz de luz de baja coherencia con una longitud de onda cercana al infrarrojo, entre 820 y 840 nm (86). La OCT permite realizar una medida cuantitativa directa y objetiva del espesor de la CFNR, así como de las estructuras anatómicas papilares: anillo, disco y excavación. La llegada de la OCT ha supuesto una revolución en la capacidad de evaluación de la anatomía ocular, ya que proporciona un método no invasivo que permite estudiar in vivo las estructuras oculares con altísimo detalle, ofreciendo imágenes que se aproximan a las obtenidas mediante histología (87). Tras una exploración de pocos minutos, se definen diagramas de espesor de la

CFNR que permiten detectar glaucoma en estadios muy incipientes. Además, la OCT se utiliza también para el estudio morfológico de la retina, ya que este instrumento es capaz de proporcionar al oftalmólogo una imagen casi histológica de las diferentes capas de la retina a nivel macular (86).

- **Flash- PEV:** El potencial evocado visual (PEV) es un potencial registrado desde la región occipital en respuesta a estímulos visuales con una respuesta de larga latencia (88). Los estímulos pueden ser de tres tipos: flash (utilizado en pacientes difíciles de examinar y en animales) (89), inversión de patrón de campo completo (usado habitualmente para el PEV, evaluando bien las vías visuales anteriores) y la inversión de patrón de medio campo (utilizada para la localización de lesiones detrás del quiasma óptico) (88). En la enfermedad glaucomatosa, está bien establecido que el daño a las CGRs y/o sus axones produce defectos en el campo visual. Sin embargo, lo que está menos claro es si las CGRs experimentan una muerte apoptótica rápida o permanecen en un estado anormal. Si se mantienen en este último estado, aumenta la posibilidad de neuroprotección de las CGRs enfermas de la retina. Un posible indicador de la salud de las CGRs es la latencia de su respuesta, utilizada como marcador de daño reversible en ensayos de agentes neuroprotectores para el tratamiento del glaucoma (90). El PEV es muy útil para detectar una alteración de la conducción visual anterior sin ser invasivo. Para el registro de PEV, se presenta un estímulo al sujeto un número seleccionado de veces, y las respuestas cerebrales son amplificadas y promediadas por una computadora, mostrándose en una pantalla de osciloscopio o impresas en papel, en medidas de amplitud y latencia (ver Figura 6). Generalmente, el PEV es provocado por la estimulación monocular de cada ojo, mientras el otro está cubierto (88). Alteraciones en la copa del disco óptico y la pérdida del campo visual se han asociado con la prolongación de la latencia del PEV (91).

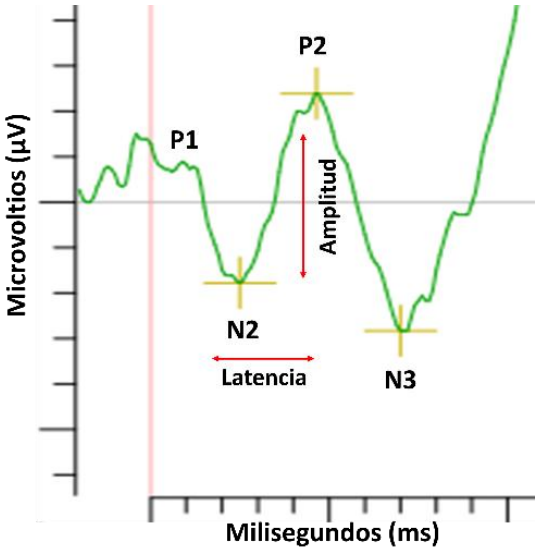


Figura 6: Análisis flash-PEV. Medidas de Amplitud (P2): Mide la función de los axones que conducen los impulsos a lo largo da vía visual y Latencia (N2): Tiempo que tarda una señal a viajar de la retina hasta la corteza visual. ***Fuente:*** *Archivo personal.*

- **<u>Respuesta Pupilar Fotocromática</u>:** El reflejo pupilar a la luz (RPL) proporciona información sobre las funciones de la vía retiniana y visual, y se evalúa de forma rutinaria durante el examen oftalmológico clínico. El descubrimiento de un subconjunto de CGRs, conocido como células ganglionares de la retina intrínsecamente fotosensibles (ipCGRs), que tienen capacidad de fototransducción (92), ha aportado una nueva comprensión al RPL (93,94). Estas ipCGRs contienen un único fotopigmento, la melanopsina (derivada de la vitamina A) (95) , con una sensibilidad espectral máxima de 480 nm, que puede ayudar a diferenciar enfermedades que afectan la retina interna, el nervio óptico y el sistema nervioso central (96).

  La despolarización de las ipCGRs se produce después de la fototransducción en los conos y bastones, por fototransducción mediada por melanopsina intrínseca, o por ambas vías. La información pupilomotora transmitida al mesencéfalo puede derivarse indirectamente de la retina externa (activación de bastones y conos) o directamente de la retina interna (activación de melanopsina) (97). La exposición de la retina a diferentes longitudes de onda de luz produce patrones de actividad celular variados. Por ejemplo, la exposición continua a luz de longitud de onda corta (azul) y alta intensidad provoca una activación intrínseca de las células de melanopsina (93), mientras que la luz de longitud de onda larga (roja) activa principalmente a los conos (95).

  La evaluación cromática con estímulos de luz roja y azul permite realizar pruebas detalladas de subpoblaciones de células retinianas y proporciona información cualitativa sobre

la posible localización del proceso patológico (95). . La constricción pupilar evaluada en la oscuridad por estímulos de luz azul tenue y brillante mide específicamente las funciones mediadas por las ipCGRs, mientras que un estímulo de luz roja brillante mide específicamente la función de los fotorreceptores (93) (ver Figura 7). Además, esta es una prueba de diagnóstico mínimamente invasiva, fácil y rápida de realizar, con una curva de aprendizaje rápida para interpretar las respuestas pupilares, sin necesidad de equipo especializado ni capacitación extensa del operador (95).

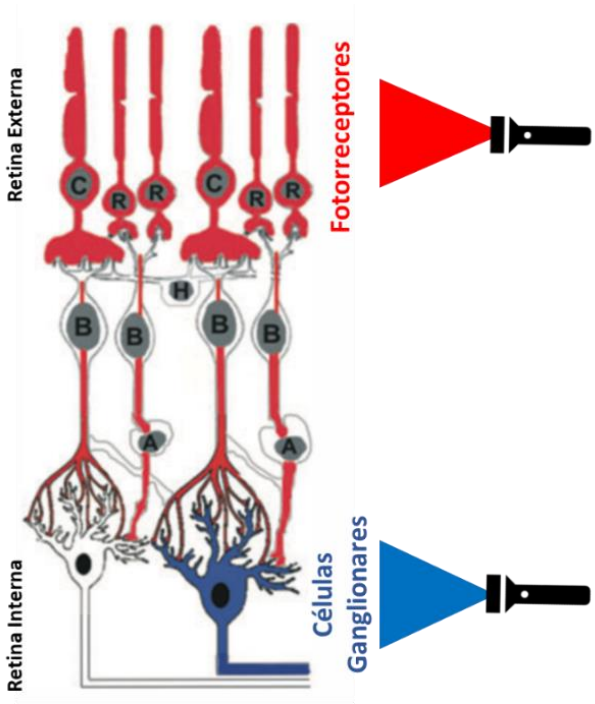


Figura 7: **Principales células activadas en la Prueba Respuesta Pupilar Fotocromática**. Luz azul (480 nm) de alta intensidad activa el pigmento fotosensible de las células ganglionares. Luz roja (630 nm) activa la ruta de los fotorreceptores. **Fuente**: *Modificado de https://animal-eye-iowa.com/cplr-physiology/*

Para la realización del estudio se utiliza un aparato calibrado que se ajusta a las propiedades espectrales de los pigmentos visuales. El instrumento cuenta con potentes fuentes de luz basadas en diodos con longitudes de onda muy estrechas para la luz azul y roja, que coinciden con las curvas de sensibilidad espectral de la melanopsina (480 nm) y las opsinas de conos y bastones (630 nm), ambas con luminancia idéntica (200 kcd/m²) (ver Figura 8). No es necesario dilatar la pupila, aplicar anestesia ni utilizar métodos invasivos para su uso (95). . Solo se requiere una breve adaptación a la oscuridad antes de la prueba. Durante la iluminación, el diámetro pupilar en individuos normales debe disminuir al ser estimulado con luz azul. Sin

embargo, en presencia de cambios patológicos, como en el glaucoma, la constricción pupilar no se produce al aplicar luz azul de baja/alta intensidad, lo que indica daño en las células evaluadas (92,95). Los cambios patológicos en fotorreceptores específicos pueden resultar en una respuesta eléctrica anormal, evidente en un RPL completo o con presencia de escape pupilar, particularmente después de una iluminación intensa (95).

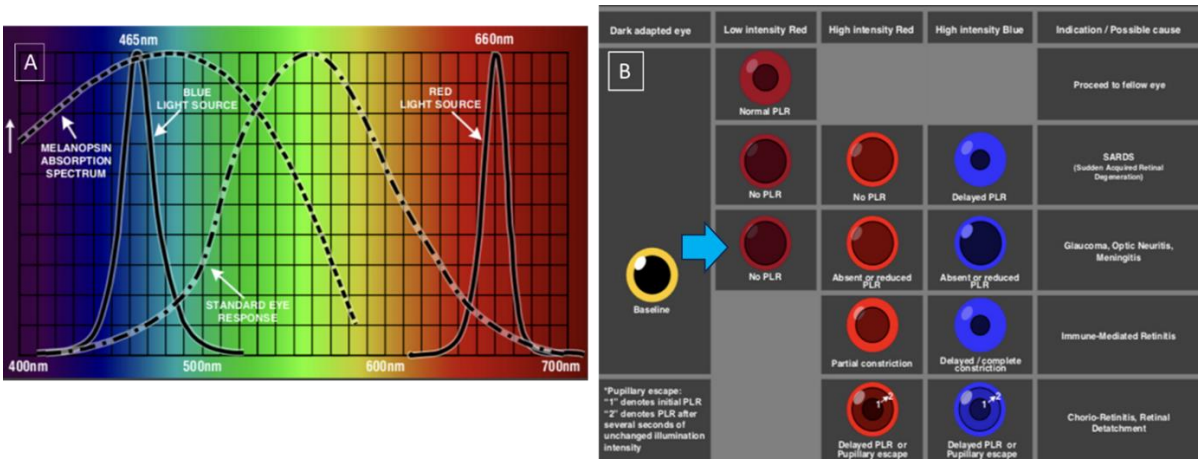


Figura 8: **Principio fisiológico de la Prueba de Respuesta Pupilar Fotocromática**. **A**) La emisión de las fuentes de luz azul y roja se superpone a la respuesta estándar del ojo. Sólo la luz azul (480 nm) provocará una respuesta pupilar mediada por melanopsina correspondiente a las ipCGRs. **B**) Esquema de interpretación del aparato. **Fuente:** *Modificado de https://www.retinographics.com/index.html*

Las CGRs son particularmente vulnerables a la patología glaucomatosa, por lo que la utilización de un método que detecte la actividad de las CGRs es fundamental para el pronóstico de la enfermedad (98). En este estudio, se evaluará la respuesta pupilar fotocromática (RPF) en conejos sometidos a HO, pues ya existen estudios que indican una función similar de las CGRs que expresan melanopsina en otras especies (97).

1.4 SISTEMA INMUNE: UNA VISIÓN GENERAL

Existe una interacción constante entre los organismos y su entorno a lo largo de toda su vida (99). Como resultado de este intercambio, los organismos han desarrollado diversos mecanismos para identificar y eliminar agentes patógenos, diferenciando lo propio de lo extraño, y produciendo tolerancia hacia los componentes propios (100). Estos mecanismos varían en complejidad según la ubicación del organismo en la escala biológica (99). Esta respuesta defensiva ante agresiones endógenas y/o exógenas, que se lleva a cabo por la acción conjunta de células y moléculas, se

conoce como respuesta inmune (101). Toda sustancia capaz de desencadenar una respuesta inmune se denomina antígeno (Ag) (99,102).

La respuesta inmune se divide en dos sistemas: el innato y el adaptativo (103). El sistema innato es la primera línea de defensa cuando el hospedador entra en contacto con un patógeno. Se activa de manera rápida y precede a la inmunidad adaptativa en la respuesta defensiva. Sin embargo, ambos sistemas funcionan de manera integrada (104). El organismo cuenta con barreras naturales de defensa, como las barreras hematooculares en el caso del ojo, que intentan impedir la entrada de patógenos, ya sea de forma física o química. Cuando estas barreras son dañadas, se activa la respuesta inmune (99,101) (ver Figura 9). Ambas respuestas, innata y adaptativa, se caracterizan por la presencia de sustancias solubles o humorales y componentes celulares que pueden ser compartidos o específicos de cada tipo de respuesta (99).

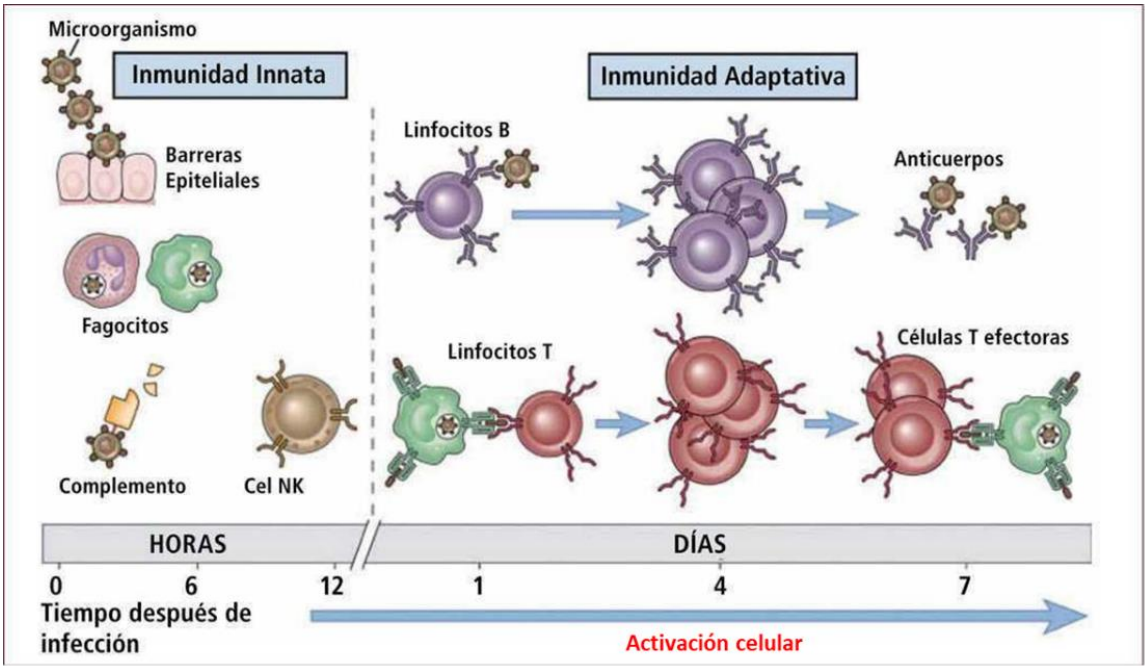


Figura 9: **Evolución cronológica de la respuesta inmune. Fuente***: Modificado de* (99).

1.4.1 Sistema Inmune Innato

El sistema inmune innato está compuesto por diversos componentes, que incluyen barreras físicas y químicas (como epitelios y enzimas), células fagocíticas (neutrófilos polimorfonucleares, células dendríticas y macrófagos), células asesinas naturales (NK), el sistema del complemento, citoquinas y receptores tipo Toll (*Toll-like-receptors* [TLRs]) (101,104).

La respuesta innata se activa de inmediato tras la penetración de un agente agresor (105), comenzando con la activación y fijación del complemento a los agentes exógenos (100). Las células fagocíticas (neutrófilos polimorfonucleares, células dendríticas y macrófagos) inician el proceso de fagocitosis, reconociendo y respondiendo a estos agentes mediante distintos receptores de reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), como los TLRs, los receptores de manosa y los asociados a la proteína G, que pueden reconocer péptidos pequeños, destruir y eliminar los agentes extraños (103). Simultáneamente, estas células inducen la secreción de citoquinas, como el interferón gamma (INF-γ) y el TNF-α, y la expresión de moléculas coestimuladoras (104), lo que también promueve la inflamación. La inflamación atrae nuevas células, como los monocitos sanguíneos derivados de la médula ósea, que se diferencian en macrófagos en el sitio de invasión, y moléculas que intentan erradicar la infección y reparar los tejidos dañados (103). Esta reacción inflamatoria local inicial, característica de la respuesta innata, se manifiesta por calor, dolor, rubor y tumor. El proceso inflamatorio es esencial para la defensa del organismo, pero, si no se controla, puede dañar las estructuras celulares, siendo desencadenado por bacterias, virus, parásitos o lesiones físicas (99).

Además de sintetizar TNF-α, los macrófagos también producen citoquinas como la IL-1 e IL-8, que tienen un alto poder de quimiotaxis y activan a los neutrófilos circulantes, los cuales migran a los sitios extravasculares. Esta migración es mediada por moléculas expresadas en las membranas de los neutrófilos, como el antígeno asociado a funciones de linfocitos 1 (LFA-1) y las moléculas de adhesión intercelular (ICAM-1 e ICAM-2), inducidas por la IL-1 y el TNF-α de origen macrofágico, que a su vez inducen cambios en el endotelio, activando la migración de neutrófilos (99). La activación de los neutrófilos provoca la liberación de productos intermedios de oxígeno y la exocitosis del contenido de sus gránulos citoplasmáticos, especialmente elastasa y defensinas, además de metabolitos del ácido araquidónico (tromboxanos, leucotrienos) y fragmentos C3a y C5a del sistema del complemento (100). Este proceso hace que los neutrófilos sean las primeras células defensivas en llegar al sitio de infección, acumulándose en las primeras 24 horas. Posteriormente, los macrófagos, debido a su distribución, tardan más en llegar para fagocitar los microorganismos invasores (99). Los neutrófilos capturan y destruyen a los agentes patógenos, mientras que los macrófagos y, en mayor medida, las células dendríticas, además de destruir los patógenos, los procesan y presentan combinados con moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) a una subpoblación especializada de linfocitos T, especialmente a los linfocitos $TCD4^{+}$ (100,106).

El MHC está compuesto por un conjunto de glicoproteínas codificadas por genes, cuyos productos se expresan en la superficie de las células del sistema inmune. La principal característica de estos genes es su elevado polimorfismo, es decir, la gran cantidad de variaciones en cada individuo (107). Los genes del MHC cumplen un rol central tanto en la respuesta inmune celular como en la humoral. Existen dos tipos de moléculas del MHC: clase I (presentes en todas las células nucleadas) y clase II (presentes en las células presentadoras de antígenos, CPA, como linfocitos B, macrófagos y células dendríticas) (108,109). La restricción de clase I o clase II del HMC por parte de los linfocitos T se correlaciona más con la presencia de moléculas correceptoras en la membrana celular ($TCD4^+$, $TCD8^+$) que con las características funcionales de las mismas. Las CPA de clase I son reconocidas por células $TCD8^+$, mientras que las de clase II por $TCD4^+$ (107). Con relación a las CPA, estas presentan una alta capacidad inmunoestimuladora induciendo la actividad de los linfocitos $TCD4^+$ y se encuentran en órganos como la piel, los nódulos linfáticos, el bazo, debajo del epitelio y en el timo. En el ojo, las células dendríticas se localizan en el epitelio y endotelio corneal (102), en el estroma del iris en la cámara anterior (110) y en el epitelio pigmentario de la retina (102).

1.4.2 Sistema Inmune Adquirido

La respuesta inmune adquirida se caracteriza por su alta especificidad, su capacidad para responder a una amplia variedad de antígenos, su falta de reactividad hacía lo propio y su capacidad para generar memoria (101). Ante la presencia de un patógeno, las células presentadoras de antígenos (CPA) son esenciales para procesarlo y mostrar los péptidos antigénicos a los linfocitos T, permitiendo que estos los reconozcan como extraños y desencadenen mecanismos para eliminarlos, mejorando la capacidad defensiva del organismo frente a exposiciones sucesivas (99,101).

Las respuestas inmunes innata y adquirida están íntimamente relacionadas. Una vez que el antígeno es reconocido y presentado por las CPA a través del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), los linfocitos T activan dos subpoblaciones clave de células de la inmunidad adaptativa: los linfocitos TCD8+ (citotóxicos), que destruirán células infectadas o alteradas, y las células T ayudadoras (Th) TCD4+, que activarán otras células, incluidas las células B, que madurarán en plasmocitos para secretar anticuerpos y así hacer la respuesta inmune más efectiva. Inicialmente, se activa la inmunidad innata, donde los microorganismos son fagocitados y se activa el sistema del complemento. Posteriormente, las CPA procesan estos microorganismos para que los linfocitos Th los reconozcan, activando la respuesta inmune adaptativa tanto humoral

como celular. Los anticuerpos formados se unirán a los microorganismos, potenciando la activación del complemento y la fagocitosis (100).

- **Respuesta Inmune Humoral**: La respuesta inmune humoral es el principal mecanismo de defensa frente a infecciones bacterianas y está mediada por anticuerpos o inmunoglobulinas secretados por los linfocitos B que se diferencian en plasmocitos. Las células B residen y circulan en los nódulos linfoides y el bazo. Cuando encuentran su antígeno específico, se unen a él a través de su receptor (BCR) y se activan, produciendo anticuerpos llamados inmunoglobulinas (inicialmente IgM, seguidos de IgG, IgE o IgA) (102). Los anticuerpos inician sus efectos biológicos al unirse al Ag (104). a interacción entre el anticuerpo y su antígeno específico activa los linfocitos B naïve, iniciando la respuesta inmune humoral (99). Además de diferenciarse en plasmocitos, los linfocitos B pueden actuar como CPA presentando el antígeno a su linfocito T específico, el cual secretará citoquinas. Los linfocitos Th2 secretan IL-4, que induce la secreción de IgE por parte del linfocito B, mientras que los linfocitos Th1 secretan INF-γ e IL-12, induciendo la secreción de IgG (104).
- **Respuesta Inmune Celular:** La respuesta inmune celular es el principal mecanismo de defensa frente a microorganismos intracelulares y está mediada por linfocitos T, que se dividen en dos subpoblaciones principales: linfocitos $TCD4^+$ (secreción de citoquinas) y linfocitos $TCD8^+$ (eliminación de células infectadas y tumorales). Cuando el antígeno ingresa al organismo, es captado por las CPA, transportado al nódulo linfoide regional o al bazo, y procesado en péptidos que se expresan en la membrana de la CPA. Los linfocitos T no activados recirculan continuamente a través de los nódulos linfoides. Cuando un linfocito T encuentra su antígeno específico en el ganglio, lo reconoce a través de su receptor TCR, se activa, prolifera y se diferencia en linfocitos T efectores y de memoria (104,111,112). Los linfocitos T efectores migran hacia los sitios de inflamación donde encuentran el antígeno para el cual son específicos. La subpoblación de linfocitos TCD4+ efectores secreta citoquinas que ayudan a los macrófagos a eliminar los microorganismos fagocitados e inducen la diferenciación de los linfocitos B para secretar anticuerpos que se unen a los antígenos. Las citoquinas sintetizadas por las células T varían según la subpoblación Th que las sintetice. Las células $TCD4^+$ pueden diferenciarse en varios subtipos, siendo las más conocidas las células Th1 y Th2 (113) (Ver figura 10).

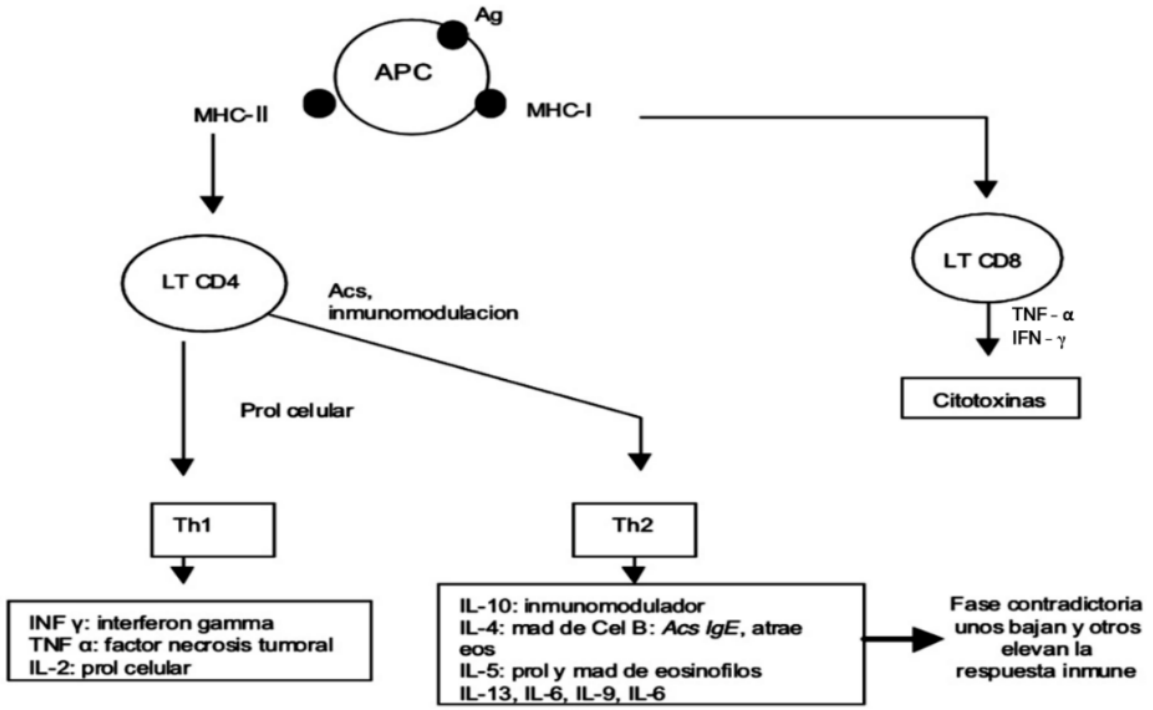


Figura 10: Activación de linfocitos y producción de citoquinas. El antígeno entra en contacto con la CPA. La CPA expresa el HMC-I (estimula los TCD8$^+$ a producir citotoxinas) o HMC- II (activan células TCD4$^+$ produce citoquinas tipo Th1 (proliferación celular) o Th2 (regulación de la respuesta inmune y activación de LB para producción de anticuerpos). **Fuente***: Modificada de Revista Colombia Médica; 2002; 33: 113-122***.**

La diferenciación de linfocitos TCD4+ hacia linfocitos Th1 es estimulada por bacterias intracelulares, virus, algunos parásitos y antígenos proteicos administrados con adyuvantes potentes que inducen la secreción de IFN-γ, IL-2, IL-12 y TNF-α (114). Por otro lado, la diferenciación de linfocitos TCD4$^+$ hacia linfocitos Th2 es promovida por la presencia de alérgenos y helmintos. Inicialmente, estos estímulos inducen la producción de IL-4 en mastocitos, basófilos, eosinófilos y linfocitos TCD4$^+$. La IL-4 amplifica la respuesta Th2 e inhibe el desarrollo de respuestas Th1 y Th17. Además, los linfocitos Th2 inducen la secreción de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 (104), lo que resulta en la activación de linfocitos B y la síntesis de diferentes clases y subclases de inmunoglobulinas (115). También se han descrito recientemente los linfocitos Th17, que corresponden a una subpoblación de linfocitos T generada por el estímulo de IL-23 y que secretan IL-17, IL-21 e IL-22, promoviendo efectos proinflamatorios similares a los del TNF-α, IL-1 e IL-6 (104).

1.4.3 Inmunología Ocular

El ojo es considerado un órgano inmunoprivilegiado, ya que su estructura y mecanismos de defensa están diseñados para prevenir o modificar respuestas inmunes innatas y adaptativas,

evitando así casi por completo (116), el desarrollo de procesos inflamatorios locales que puedan interferir con una buena visión (101). Este órgano tiene la capacidad única de activar respuestas inmunes incluso en ausencia de inflamación evidente. La regulación inmunológica en el ojo se lleva a cabo mediante diversos mecanismos activos, como la creación de un ambiente local inmunosupresor, la acción de factores solubles, la inducción de apoptosis a través de la vía Fas-FasL, y mecanismos supresores específicos de las células epiteliales pigmentarias.

Estos procesos son altamente efectivos y, de hecho, los antígenos presentes en el ojo pueden inducir una tolerancia sistémica específica (117), lo que significa que el sistema inmunológico del cuerpo no monta una respuesta inmune contra ellos. Los sitios inmunoprivilegiados, como el ojo, son conocidos por su capacidad para aceptar injertos de tejido extraño con gran eficiencia, lo que se atribuye a la habilidad del sistema inmune local para regular la respuesta inmunitaria de manera que no cause daño al tejido ocular ni afecte negativamente la visión (101) .

Diversos mecanismos superpuestos hacen del ojo un órgano más inmunoespecializado que inmunoprivilegiado: 1) Presencia de barreras oculares en segmento anterior y posterior; 2) Ausencia de vasos sanguíneos en la córnea; 3) Ausencia de drenaje linfático en la cámara anterior (el contenido de la cámara anterior del ojo se drena directamente a la circulación venosa); 4) Presencia de factores inmunosupresores que incluyen neuropéptidos, α-MSH (hormona estimulante de los melanocitos), somatostatina, inhibidores del complemento (118) y un inhibidor de la actividad de las células NK(119). Además de factores inmunomoduladores solubles (TGF-β) en humor acuoso secretados por el cuerpo ciliar y MT (120), con características de suprimir la activación de una amplia variedad de células y moléculas involucradas en la inflamación y la inmunidad destructiva (121); 5) Las células del estroma del iris, el cuerpo ciliar y la retina del ojo son capaces de convertir las células T inmunitarias en células T reguladoras (Treg) (122); 6) Presencia de CPA que promueven la tolerancia, la cual protege el ojo del daño colateral irreversible de la inflamación que puede llevar a la ceguera (120); 7) Resistencia al rechazo inmune: debido a baja expresión del HMC de clase II y algunas CPA carecen de moléculas B7-1 (CD80) y B7-2 (CD86) impendido la activación de los linfocitos T, además de su unión a la molécula de HMC (117,123); 8) Capacidad de inducir desviación inmune después de la presentación de antígeno en el ojo y 9) Expresión de las moléculas inductoras de apoptosis como PDL-1 y FasL que son expresadas por las células del estroma del iris, epitelio de la córnea, epitelio pigmentario de la retina y humor acuoso. Estas moléculas inducen apoptosis de las células inmunes que traspasan los límites oculares (124). La combinación de estas características y sus acciones conjuntas hacen que el microambiente ocular sea altamente antiinflamatorio (125).

- ***Inmunidad ocular: segmento anterior***

El privilegio inmunológico del ojo y su microambiente intraocular inmunosupresor son notables por su capacidad para resistir la inflamación, la infección y el trauma. Esta capacidad se atribuye en parte a la presencia de barreras hematooculares, que se encuentran tanto en el segmento anterior como en el posterior del ojo. La barrera anterior, también conocida como barrera hemato-acuosa, está compuesta por uniones estrechas en el epitelio no pigmentado del cuerpo ciliar. Los vasos sanguíneos del cuerpo ciliar son fenestrados, lo que permite el paso de componentes del plasma al estroma, pero la porción epitelial de la barrera regula el paso de fluidos hacia la cámara posterior (102). Además de estas barreras físicas, el segmento anterior del ojo alberga células inmunes residentes con el potencial de actuar como CPA, como los macrófagos y las células dendríticas, que se localizan en el iris y el cuerpo ciliar. Estas células están ampliamente distribuidas en el estroma de estas estructuras y desempeñan un papel crucial en el sistema inmunitario ocular (125). Los macrófagos presentes en esta región tienden a ser predominantemente células $CD11b^+$ y $F4/80^+$, mostrando pocos signos de activación en estado de reposo. Curiosamente, estos macrófagos suelen actuar más como proinflamatorios que como inmunosupresores (126).

Estudios han demostrado que las células dendríticas residentes en el iris tienen la capacidad de inducir la proliferación de células T in vitro, mientras que los macrófagos no ejercen este efecto (127). Sin embargo, se ha descubierto que los macrófagos del iris pueden promover la proliferación de células T específicas de Ag (128). Esta distinción entre células dendríticas y macrófagos puede explicar por qué, tras la absorción de antígenos, las células dendríticas residentes migran a los ganglios linfáticos para inducir respuestas de células T, mientras que los macrófagos residentes pueden potenciar esas respuestas dentro del tejido (129). Además, se ha identificado la presencia de células dendríticas plasmocitoides (pDC) en el ojo, (ver figura 11) las cuales constituyen una subpoblación única de células inmunes. A diferencia de las células dendríticas clásicas, las pDC no expresan $TCD3^+$, CD20 ni CD22, pero sí expresan CD68 e IL-3Rα (CD123) (CD123) (129,130).

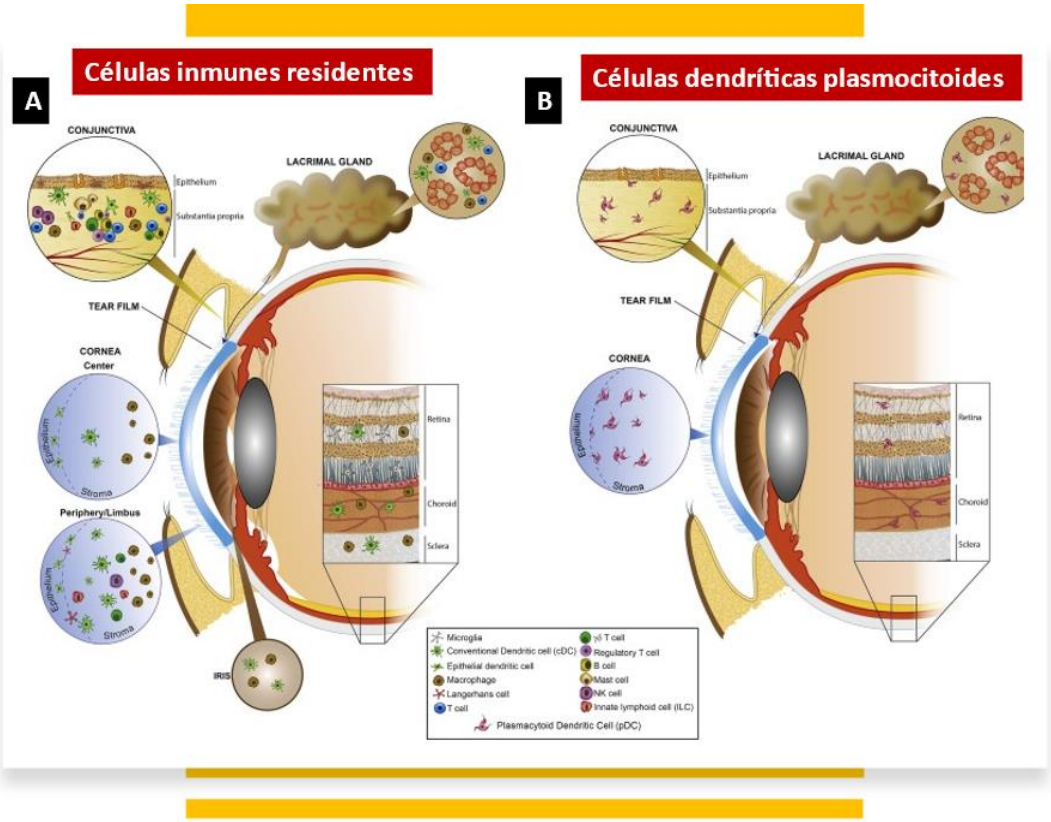


Figura 11: Localización de células inmunes residentes en los tejidos oculares. (**A**) cDC residentes: *conjuntiva*: macrófagos, células B y células T; córnea: macrófagos; *coroides*: macrófagos; *retina*: microglía y macrófagos perivasculares; glándula *lagrimal*: macrófagos, células T y células B. (**B**) pDC residentes: córnea central y periférica, limbo, conjuntiva bulbar, coroides, retina y glándula lagrimal. **cDC**: célula dendrítica clásica; **pDC**: célula dendrítica plasmocitoide. **Fuente:** *Modificado de* (129).

Similar a las células dendríticas convencionales, las células dendríticas plasmocitoides (pDC) tienen la capacidad de secretar diversas citoquinas y quimiocinas, incluyendo IFN, TNF-α, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 e IL-12 (131–133). A través de esta secreción, las pDC se comunican con otras células inmunes y con las células circundantes en los tejidos, dirigiendo respuestas proinflamatorias o antiinflamatorias, aunque su eficiencia en la promoción de la proliferación de células T es menor en comparación con las células dendríticas convencionales (134). A pesar de la presencia de la barrera hematoacuosa, los linfocitos T activados pueden penetrar a través del epitelio pigmentario del iris y ser reconocidos por las células presentadoras de antígenos (CPA). La inhibición de la activación de los linfocitos T por parte de las CPA depende de su contacto íntimo con los receptores de las células T, así como de la secreción de factores solubles que suprimen estas células. Por lo tanto, el epitelio

pigmentario ocular se considera una barrera inmunitaria, ya que cualquier célula T que ingrese al ojo debe pasar a través de esta capa (120).

- **Desviación inmune asociada a la cámara anterior (ACAID)**

En relación con la desviación inmune asociada a la cámara anterior (ACAID), ante cualquier alteración en el microambiente ocular, las CPA F4/80$^+$ presentan los antígenos a los receptores TCR de las células T, lo que lleva a la diferenciación de estas células en subconjuntos, como las células TCD8$^+$ y TCD4$^+$, así como sus subtipos, como las células Th1, Th2 y Th17. Simultáneamente, se produce la infiltración de monocitos circulantes en la cámara anterior debido al aumento de quimiocinas y TNF-α (135). Se ha observado que al menos dos tipos de CPA contribuyen a la activación de estas células T: las CPA derivadas de los ojos y las células B esplénicas (116). Una de las particularidades del privilegio inmunológico en la cámara anterior es la ausencia de canales linfáticos, que solo están presentes en la conjuntiva y la esclerótica. El humor acuoso en la cámara anterior drena a través de la red trabecular del canal de Schlemm, que lo conduce directamente a la circulación venosa. Esta misma vía de drenaje es utilizada por las CPA en la cámara anterior, que migran directamente al torrente sanguíneo a través de la malla trabecular hacia los ganglios linfáticos locales (cervicales), los ganglios mesentéricos, el timo y el bazo (136).

En este contexto, las CPA F4/80$^+$ trasladan el antígeno al timo, donde activan a los timocitos reguladores, también conocidos como células NKT reguladoras, que posteriormente migran al bazo (135,137). Aunque no se ha definido con precisión la función del timo en la inducción del ACAID (116), se sabe que los linfocitos T reguladores naturales originarios de este órgano son capaces de reconocer el HMC y expresar el receptor de células TCR, representando aproximadamente el 5-10% de las células TCD4$^+$ (138). Además, las células NKT derivadas del timo dependen de la presencia de CD-1d y solo se generan si las CPA oculares expresan CD-1d en su superficie. El CD-1d es similar al HMC de clase I y presenta glicolípidos al receptor de células T en las células NKT (139).

- **ACAID: células presentadoras de antígenos en el bazo**

En el bazo, las CPA y las células NK reguladoras provenientes del timo se localizan en la zona marginal de este órgano (137). Las CPA derivadas del ojo presentan características que las distinguen de otras CPA: tienen la capacidad de expresar CD-1d y sobreexpresan ciertas citoquinas como IL-10, IL-13 y MIP-2 (proteína inflamatoria de macrófagos 2), además de una expresión limitada de IL-12 (139,140). Dentro del bazo, las CPA oculares producen MIP-2, que atrae a las células NK TCD4 $^+$ que

a su vez producen un “regulado en la activación, células T normales expresadas y secretadas” (RANTES). RANTES es una quimiocina que recluta CPA y células $TCD8^+$ en la zona marginal. Esto da lugar a agrupaciones multicelulares en la zona marginal del bazo, que incluyen CPA oculares, células B, células NK, células $TCD4^+$, células T gamma-delta , y células $TCD8^+$ (139). Tanto las poblaciones de células $TCD4^+$ como las $TCD8^+$ son específicas de antígeno, por lo que deben encontrar antígenos oculares presentados en moléculas de HMC-II y HMC-I, respectivamente (139).

Las CPA F4 / 80^+ oculares deben unirse al tercer componente del complemento (C3) a través de su receptor C3b para inducir el ACAID (141). Este proceso induce a las CPA oculares a producir mayores cantidades de IL-10 y TGF-β, mientras regulan negativamente su producción de IL-12. Bajo la influencia de IL-10 y TGF-β, las CPA oculares procesan los antígenos y los liberan en la zona marginal del bazo, donde son capturados por las células B. Estas células B presentan los péptidos antigénicos a las células $TCD8^+$, lo que conduce a la formación de células T supresoras (139,142). A partir de esta etapa, ocurre la proliferación de células B y el reprocesamiento de los péptidos de antígeno para la formación de células reguladoras $TCD4^+$ (aferentes) y $TCD8^+$ (eferentes) (143).

Una vez que los linfocitos T reguladores son activados, desencadenaran el proceso de hipersensibilidad de tipo tardía o retardada caracterizando la respuesta inmune del ACAID (ver figura 12). Este proceso está compuesto de 2 fases: a) fase “aferente”: mediada por linfocitos $TCD4^+$ que suprimen la activación inicial y se diferenciación en subtipos Th1 (proinflamatorios) y actúan en órganos linfoides secundarios y b) la fase “eferente”: mediada por linfocitos $TCD8^+$ supresores, que inhiben la expresión de la respuesta mediada por Th1. Los linfocitos activados regresan por la vía eferente hacia la cámara anterior, favoreciendo el mecanismo de autorregulación de la respuesta inmune inflamatoria (116).

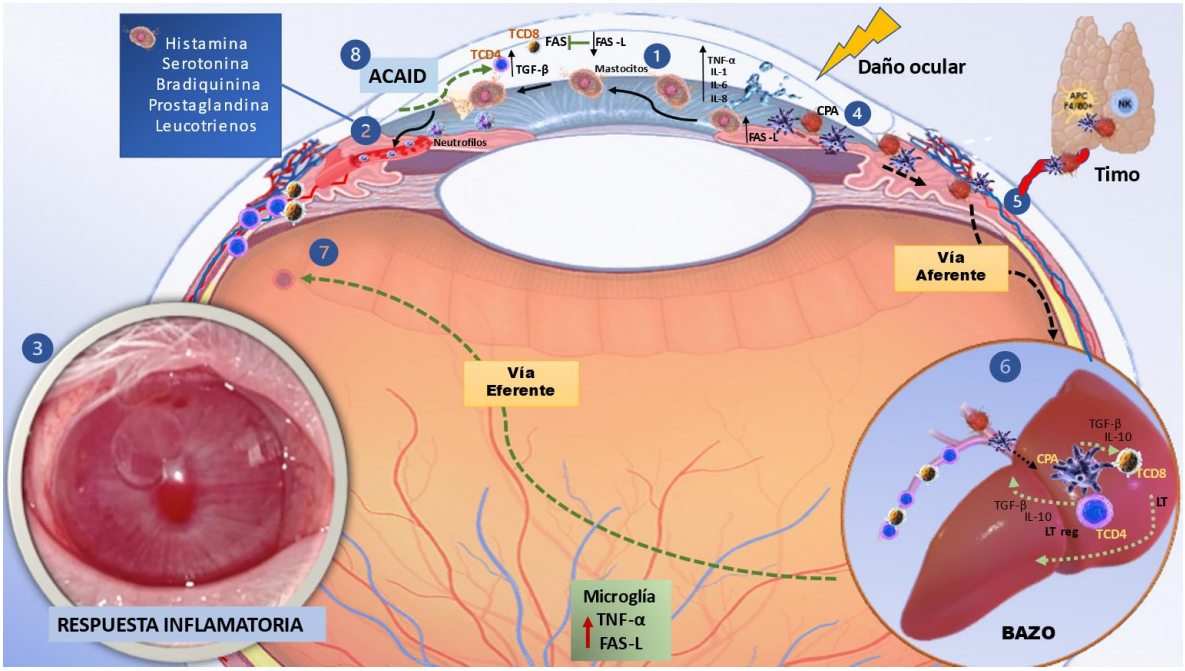


Figura 12: Representación esquemática del ACAID frente a un daño ocular. La inducción del ACAID depende de la homeostasis de los factores presentes en la cámara anterior. **1)** Detección y movilización de mastocitos hacia el Ag, activando la liberación de mediadores inflamatorios; **2)** Movilización de neutrófilos ubicados en el centro del vaso sanguíneo: marginación, adhesión, diapédesis y quimiotaxis con intento de capturar el antígeno; **3)** Signos inflamatorios oculares: hiperemia conjuntival, hiperemia del iris, endotelitis y miosis; **4)** Las CPA detectan alteraciones en la cámara anterior, capturan antígenos y liberan citoquinas. Después, migran rápidamente hacia fuera del ojo por vía sanguínea y van al timo y al bazo; **5)** En el timo, las CPA inducen generación de NK que posteriormente salen del timo y migran hacia el bazo; **6)** En el bazo, forman agrupaciones con células $TCD4^+$, células $TCD8^+$. Las CPA generan una activación de los linfocitos reguladores $TCD4^+$, capaces de inhibir el perfil de las células Th1 y la activación de las células $TCD8^+$; **7)** Los linfocitos activados y los linfocitos supresores migran hacia el ojo favoreciendo el mecanismo de autorregulación de la respuesta inmune inflamatoria y **8)** En la cámara anterior aumenta la producción de citoquinas proinflamatorias y reduce la activación de FAS-L. Además, ocurre la activación TGF-β de su forma inactiva para su forma activa, garantizando la regulación del ambiente. **CPA** (célula presentadora de antígeno); **NK** (células asesinas naturales). **Fuente:** *Archivo personal.*

Además del ACAID, la cámara anterior también contiene sustancias que mantienen la homeostasis del ambiente intraocular. Entre estas sustancias se encuentran el péptido intestinal vasoactivo, la somatostatina, el TGF-β y el cortisol, cuya función es crear un microambiente intraocular que regula la actividad de macrófagos y células dendríticas (95). Además, en el humor acuoso se ha identificado un péptido relacionado con el gen de la calcitonina, responsable de inhibir la producción de óxido nítrico por macrófagos activados, un mecanismo crucial del sistema inmunitario innato (138).

- **El papel del Fas-FasL en el ojo**

Además de las células inmunes residentes en el ojo, es posible encontrar proteínas de membrana como Fas y FasL, que contribuyen a los mecanismos de privilegio inmunológico. Fas es un miembro de la familia de receptores para el TNF, mientras que FasL es homólogo al TNF. FasL se expresa en ubicaciones estratégicas del ojo para proteger las barreras hematooculares, induciendo apoptosis celular. El FasL soluble (sFasL) puede inhibir la apoptosis mediada por FasL al competir con el receptor Fas, y su presencia en el humor acuoso es indicativa de una ruptura en este sistema protector (144) . Se ha descrito que la apoptosis mediada por Fas/FasL elimina específicamente las células Th1, dejando intacta la respuesta Th2 (145). En un ambiente potencialmente inflamatorio, la estimulación repetitiva de los linfocitos T induce la expresión de Fas en su superficie, permitiendo la unión con FasL localizado en la superficie celular, lo que activa la vía de las caspasas e induce apoptosis (146) (ver figura 13). Además de este mecanismo, la presencia de factores solubles como TGF-β e IL-10 en la cámara anterior del ojo podría estar relacionada con el efecto inhibitorio de los Treg provenientes de la circulación (147).

Experimentos han demostrado que el humor acuoso presente en la cámara anterior puede tener características antiinflamatorias en ojos inflamados y bajo ataque autoinmune. Sin embargo, los factores inmunomoduladores cambian notablemente en tales condiciones (116). Por lo tanto, la capacidad del microentorno intraocular para ser antiinflamatorio e inmunosupresor reside en las características moleculares únicas del humor acuoso y vítreo, así como en las propiedades de las superficies celulares (como el epitelio pigmentado) que rodean los compartimentos intraoculares y forman una barrera inmunitaria contra moléculas y células transmitidas por la sangre que podrían amenazar la integridad del eje visual (120).

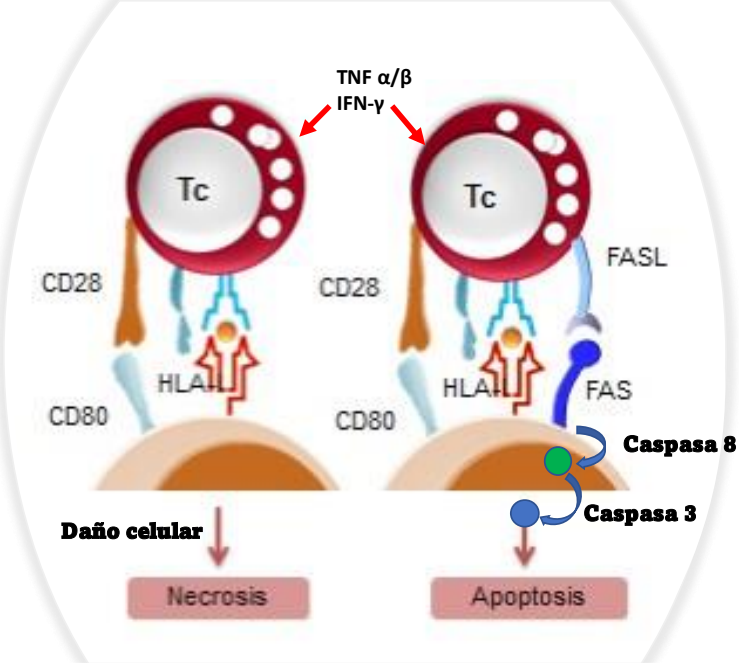


Figura 13: **Mecanismo de muerte celular**. Ocurre la unión de los receptores TCR y sus ligandos y consecuente liberación de citoquinas. **A) Necrosis**: muerte de la célula blanco, ocasionada por el daño de la membrana celular con aparición de poros y el subsiguiente desequilibrio electrolítico y B) Apoptosis: *FASL* presente en la membrana de las células efectoras después de su activación. Este ligando interactúa con las moléculas FAS de la célula blanco, iniciando una vía lítica de muerte programada. **Fuente***: Modificado a partir Asociación para el Progreso de la Inmunología Clínica. https://inmunosalud.net/index.php/defensas/79-10-acciones-del-sistema-inmune).*

- ***Inmunidad ocular: segmento posterior***

El epitelio pigmentario de la retina está formado por células endoteliales, rodeadas de astrocitos que secretan TGF-β, el factor neurotrófico derivado de la glía y el factor de crecimiento fibroblástico básico (BFGF) (148,149). Además, el epitelio pigmentario presenta pericitos perivasculares, adheridos entre sí por uniones estrechas formadas por moléculas de adhesión de unión (JAM) y cadherinas (101). Estas uniones forman una barrera impermeable que evita que células y moléculas transmitidas por la sangre desde los capilares de la coroides entren indiscriminadamente en el espacio subretiniano desde la coriocapilar (120). La barrera hematorretiniana, además de ofrecer protección, permite el paso de nutrientes hacia el sistema nervioso, regula el flujo de iones y facilita la excreción de desechos tisulares. Además de los astrocitos, las células de Müller actúan como un sistema de comunicación metabólica entre los vasos y las neuronas, secretando factores neurotróficos y siendo un componente esencial de la barrera hematorretiniana Estas células son resistentes a situaciones isquémicas, hipoxia e hipoglucemia (151), y pueden sobrevivir en condiciones adversas gracias a su metabolismo. En tales

circunstancias, las células de Müller producen TNF-α, que tiene un efecto protector sobre las neuronas de la retina (152).

La microglía pertenece al linaje de los fagocitos mononucleares y se considera la población inmune residente del sistema nervioso central. Aunque su función fagocítica está disminuida en comparación con otros tejidos, la microglía realiza funciones similares, como fagocitosis, endocitosis, inducción de inflamación y presentación de antígenos (32). A pesar de encontrarse disminuida su función como célula fagocítica, la microglía presenta un comportamiento más de célula glial que de macrófago. Sin embargo, cabe destacar que, durante el curso de diversas alteraciones del sistema nervioso, la microglía exacerba múltiples funciones efectoras macrofágicas así como, la expresión de determinadas moléculas que la permiten mediar en el proceso de muerte o reparación celular (153). Los estudios han sugerido que la microglía dentro del parénquima nervioso se puede encontrar al menos en tres estados morfológicos diferentes: estado de reposo o quiescente, un estado reactivo y otro en el que la célula se encuentra activa con capacidad fagocítica (31,32).

En el estado de reposo, esta célula glial presenta como característica un cuerpo celular pequeño del que emergen varias prolongaciones profusamente ramificadas (154), expresando en su superficie canales iónicos, moléculas de reconocimiento inmunológico y receptores de neurotransmisores, lo cual podría estar implicado en el mantenimiento de un estado inmunológico latente en condiciones normales (31). En procesos donde hay reactivación microglial, la microglía se hiperramificada con la finalidad de hacer más contactos con las terminaciones sinápticas (155). Debido a su capacidad inflamatoria, la microglía está bajo una regulación estricta proporcionada por citoquinas, neuropéptidos y hormonas antiinflamatorias (156). Esta regulación garantiza que, una vez resuelto el desafío inmune, la microglía activada regrese a un estado normal (30).

- **Respuesta de las células gliales frente a procesos patológicos**

En enfermedades neurodegenerativas como el glaucoma, las células de la microglía ubicadas en la parte interna de la retina se reactivan y migran al espacio subretiniano. Junto con los macrófagos coroideos localizados alrededor de los vasos, estas células contribuyen significativamente a los procesos inflamatorios crónicos observados en algunas patologías retinianas. En esta región, se facilita el paso de células inflamatorias entre la retina y la coroides a través de la fenestración de los capilares coroideos (117,157). Cuando las células gliales se reactivan, experimentan hipertrofia e hiperplasia; el núcleo celular aumenta de tamaño y se vuelve vesicular

con nucleolos prominentes, un fenómeno conocido como gliosis. Durante este proceso, se incrementa la liberación de sustancias neurotóxicas en el entorno, como óxido nítrico (ON), especies reactivas de oxígeno y TNF-α (158). La gliosis puede producir una cicatriz que, en algunos casos, impide la regeneración axonal debido a un aumento en la expresión de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), lo que conlleva disfunciones metabólicas y alteraciones electrofisiológicas en las neuronas (159,160).

La microglía puede tornarse reactiva debido la sobrexpresión de quimioquinas y citoquinas proinflamatorias como la IL-1β, el TNF-α y la IL-6 (32,161) (ver figura 14). Asimismo, la activación de los astrocitos puede estar relacionada con la expresión de citoquinas como IFN-γ, TNF-α, M-CSF, IL-1 e IL-6. No obstante, todas las células gliales pueden recibir señales de inhibición mediadas por neurotransmisores, neuropéptidos liberados por las neuronas y citoquinas antiinflamatorias como IL-10 y TGF-β. Estas citoquinas antiinflamatorias son secretadas para evitar efectos adversos derivados de la activación crónica de las células gliales, garantizando así una activación controlada y limitada. En procesos inflamatorios, las principales citoquinas secretadas por las células gliales son IL-1, IL-6 y TNF-α (162). Como se mencionó anteriormente, una de las funciones primordiales de las células gliales en la retina es la fagocitosis, proceso relacionado con la inmunidad innata. En su forma inactiva, la microglía presenta una capacidad fagocítica disminuida; sin embargo, en su forma reactiva, esta capacidad aumenta debido a la sobreexpresión de receptores de complemento (CR1, CR3 y CR4) (163) y TLRs (164).

Al igual que las células de Müller, los astrocitos también presentan receptores tipo TLR, que se activan una vez que la microglía alcanza su límite de capacidad fagocítica (165). Para que las células gliales puedan desempeñar su función fagocítica, primero deben reconocer al patógeno, procesarlo y presentarlo a los linfocitos con la ayuda del complejo mayor de histocompatibilidad (HMC), un proceso asociado a la inmunidad adaptativa. No obstante, las células gliales expresan bajos niveles de HMC-II, que aumentan en respuesta a señales proinflamatorias como TNF-α e IFN-γ (32,165). El ojo responde a la presencia de antígenos en la cavidad vítrea y en el espacio subretiniano mediante una respuesta adaptativa regional particular a través del sistema de Desviación Inmune Asociada a la Cámara Anterior (ACAID), que protege los tejidos oculares de la inflamación y preserva la función visual (120).

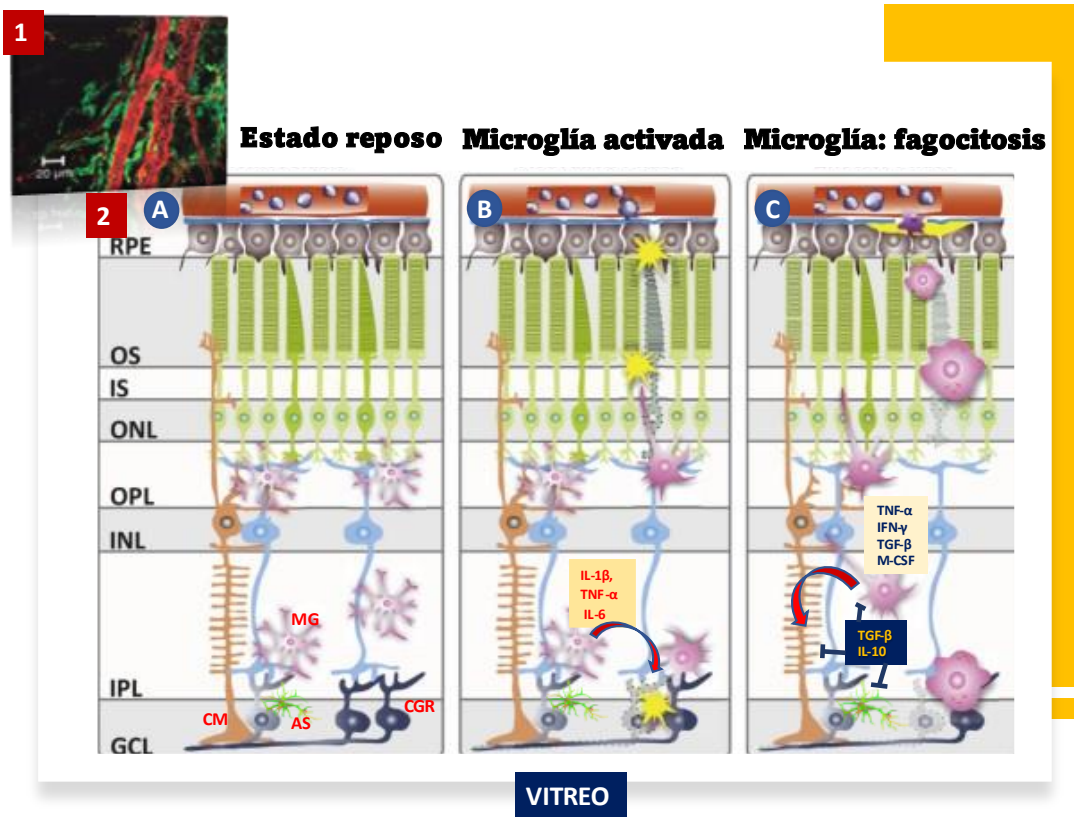


Figura 14: Activación de CPA en el segmento posterior. 1) Inmunohistoquímica coroides: Localización de macrófagos perivasculares en ratón transgénico CX3CR1-gfp. Tinción para F4 / 80^{+} (verde) y faloidina (rojo) que muestra la distribución de macrófagos perivasculares. 20µm; **2)** Representación esquemática de la actividad microglial en la retina: **A)** Estado de reposo: localización de las microglías en las capas plexiformes. Presentan largas protuberancias con la finalidad de detectar restos celulares y mantener el microambiente controlado; **B)** Microglía activada**:** La presencia de alteración el EPR, en la capa de fotorreceptores y en la capa de células ganglionares, produce la activación de la microglía mediada por la liberación de citoquinas proinflamatorias, produciendo un cambio conformacional en la microglía. **C)** Actividad fagocítica: la microglía residente activada, migra a los sitios de la lesión haciendo fagocitosis del antígeno. A partir de la activación microglial, ocurre la liberación de citoquinas capaces de regular la expresión de los astrocitos y células de Müller. Todas las células gliales son suprimidas por la activación del TGF-β y el IL-10, manteniendo la homeostasis del microambiente. **M-CSF**: Factor estimulante de colonias Macrófagos, **EPR**: epitelio pigmentario de la retina; **CM**: células Müller; **AS**: Astrocitos; **MG**: microglía y **CGR**: células ganglionares de la retina. **Fuente**: *Modificado* de (166,167).

1.4.4 Respuesta inmune en glaucoma

El papel de los factores inmunológicos en el glaucoma ha sido objeto de intensa investigación (168). La regulación de la inmunidad intraocular puede tener consecuencias perjudiciales para el ojo, dado que la respuesta inmune tiene la capacidad de causar patología. En este contexto, el glaucoma podría considerarse una consecuencia de un proceso inmunológico, en el cual la neuropatía es sostenida por la vigilancia y reparación de tejidos realizadas por células gliales,

neuronales o vasculares en el nervio óptico lesionado. Esto sugiere que la respuesta inmunitaria se activa como un esfuerzo para reparar el tejido dañado (169). Por lo tanto, el glaucoma, además de compartir características inmunológicas con otras enfermedades neurodegenerativas, muestra un mecanismo patológico multifactorial específico, posiblemente vinculado a la naturaleza particular del ojo y la retina. No obstante, no está claro si un entorno proinflamatorio local podría facilitar un proceso autoinmune, considerando que el ojo es un sitio privilegiado inmunológicamente con una homeostasis selectivamente antiinflamatoria e inmunosupresora que previene la inflamación destructiva (120,170).

Se sugiere actualmente que la inmunidad innata es un paso clave en el desarrollo del GPAA, ya que su patogénesis podría resultar de la fibrosis de la MT y la muerte de las células ganglionares de la retina (CGRs). La activación de la inmunidad innata desencadena la expresión de citoquinas inflamatorias, donde los receptores TLRs son cruciales para esta expresión durante la respuesta a antígenos endógenos o exógenos. La inhibición de estos receptores reduce la fibrosis inducida por TGF-β2 en células de la MT y mejora la supervivencia de las CGRs tanto en modelos de aplastamiento del nervio óptico como en isquemia (171).

El factor de riesgo más crítico para la progresión del daño del nervio óptico en pacientes con glaucoma es el aumento de la PIO. En el glaucoma inducido por esteroides, la elevación de la PIO se asocia con el acúmulo de glucosaminoglicanos y proteínas en la matriz extracelular del tejido conectivo juxtacanalicular, además del engrosamiento de la vaina que rodea las fibras de la MT (73) (ver figura 15). Este proceso conlleva un aumento en la actividad de las metaloproteinasas (MMPs), junto con la inhibición de la proliferación y migración de las células responsables de la fagocitosis, lo que lleva a un acúmulo de restos en la cámara anterior (68). Además, la población residual de macrófagos reclutados en la MT secreta citoquinas como IL-6 (con funciones pro y antiinflamatorias) e IL-1β y TNF-α, promoviendo el reclutamiento de otras células inmunes, incluidos linfocitos (172). La alteración de la MT produce una alteración en el sistema de drenaje de humor acuoso, debido a la presencia de una mayor resistencia impidiendo la salida del humor acuoso y como consecuencia elevando la PIO (173).

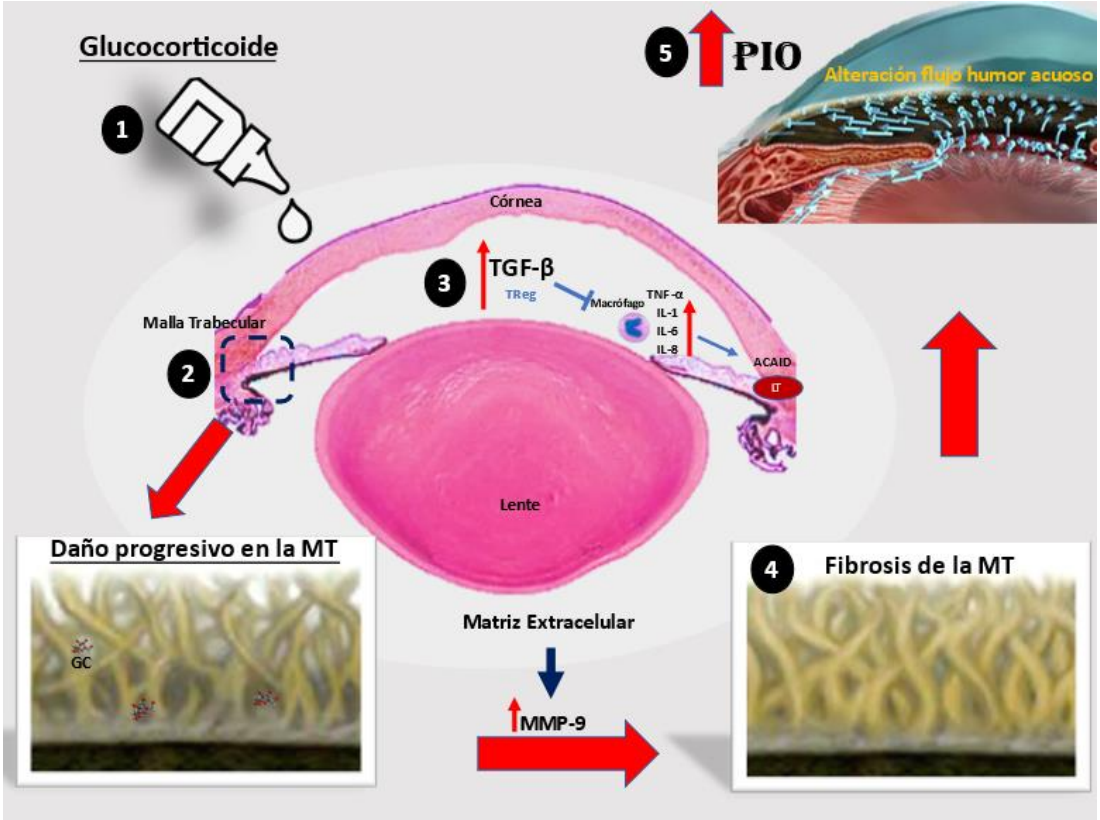


Figura 15: Esquema representativo de la alteración de la MT con consecuente aumento de la PIO con el uso de glucocorticoides. **1)** Uso de glucocorticoide tópicos a largo plazo; **2**) Acúmulo de glucosaminoglicanos en la MT alterando la matriz extracelular; **3)** Uso continuo del medicamento induce activación y sobreexpresión de TGF-β, con consecuente inhibición de la actividad fagocítica en cámara anterior. Activación de macrófagos residuales y expresión de citoquinas proinflamatorias y antinflamatorias, con activación del sistema ACAID; **4)** Daño progresivo en la matriz extracelular de la MT, induce el aumento de MMP-9 y formación de fibrosis y **5)** Bloqueo del humor acuoso con consecuente aumento de PIO. **MT**: Malla Trabecular; **GC**: glucosaminoglicanos. **Fuente:** *Modificado a partir de https://www.3bscientific.com/cl/organos-sensoriales-frances-1004123-w13318f-lieder-70700-fr,p_42_3947.html; https://varimed.ugr.es/index.php?op=viewconcepto&idconcepto=928; Malla trabecular - En Ojopedia*

El incremento de la PIO en el segmento posterior del ojo conlleva la compresión de los pequeños vasos sanguíneos y de las fibras del nervio óptico. Inicialmente, el tejido conectivo que lo compone puede adaptarse al proceso de HO (174). Sin embargo, la presión constante sobre las fibras del nervio óptico provoca una pérdida progresiva de la visión, que puede desembocar en ceguera debido a la alteración de las CGRs (175). La HO puede causar alteraciones tanto en la retina como en el nervio óptico, afectando los componentes de la matriz extracelular (MEC), como los distintos tipos de colágeno, la rigidez de las fibras elásticas, el aumento del TGF-β y, principalmente, la alteración en la MMP-1 y MMP-9 (176,177). En pacientes glaucomatosos, la MMP-9, producida principalmente por la activación de los astrocitos, se encuentra elevada. Esta elevación se

correlaciona con la reducción de la laminina, lo que dificulta las interacciones entre las células del tejido, causando apoptosis de las CGRs (178,179).

En la retina, tanto las células de Müller como los astrocitos y las células gliales desempeñan un papel crucial en la homeostasis del tejido retiniano, regulando la respuesta inmune en el sistema nervioso central (41). En las fases tempranas de la enfermedad glaucomatosa, todas las células gliales sufren gliosis en respuesta al aumento de la PIO. La activación de la microglía induce la expresión de citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias por parte de las células gliales en la retina, con el objetivo de evitar la propagación de la lesión. No obstante, en enfermedades crónicas, la gliosis proliferativa puede acelerar la neurodegeneración a través de la secreción de factores como el TNF-α, aumentando la inflamación y activando la vía apoptótica (162).

Entre las citoquinas secretadas por las células gliales, el TNF-α se considera una de las más importantes en los procesos neurodegenerativos como el glaucoma, ya que puede producir efectos tanto proinflamatorios como neuroprotectores en el segmento posterior. El efecto neuroprotector de esta citoquina se ha descrito en estudios que aplicaron inyecciones intravítreas en un ojo con sección del nervio óptico, observando la supervivencia de las CGRs. Aunque el papel del TNF-α aún no se ha definido completamente, su participación en la regulación de la viabilidad de las CGRs es indudable (180,181). La mayor secreción de TNF-α por las células gliales es capaz de activar los receptores Fas/FasL presentes en las CGRs y en la microglía, activando la vía de las caspasas y produciendo apoptosis celular (182). De manera similar, el aumento de TNF-α también induce una mayor secreción de MMPs (181).

Actualmente, se plantea la hipótesis de que el glaucoma podría tratarse de un trastorno autoinmune, ya que en muchos pacientes la enfermedad progresa incluso después de que la PIO se normaliza. Para probar esta teoría, un grupo de investigadores detectó la presencia de células inmunes en las retinas de ratones con HO, encontrando células T en este sitio. La presencia de estas células T en la retina es inusual, dado que el ojo presenta barreras que impiden su entrada. Otros estudios han revelado que las células T relacionadas con el glaucoma se dirigen a proteínas de choque térmico, que ayudan a las células a responder al estrés o a las lesiones. Aunque normalmente las células T no deberían dirigirse a las proteínas producidas por el huésped, se sospecha que estas células T fueron previamente expuestas a proteínas de choque térmico bacteriano en el periodo embriológico. Dado que las proteínas de choque térmico de diferentes especies son muy similares, las células T resultantes podrían reaccionar de forma cruzada con las proteínas de choque térmico humanas y de ratón. Para probar esta hipótesis, los investigadores

indujeron glaucoma en ratones libres de gérmenes, en los cuales la enfermedad no se desarrolló (183,184).

La infiltración de células T en la retina requiere la activación de la inflamación local, y la elevación transitoria de la PIO es suficiente para inducir este proceso. Bajo estas circunstancias, el daño neural glaucomatoso se limita a la retina y al nervio óptico, ya que la PIO elevada provoca selectivamente inflamación en estas áreas. Además de la infiltración de células T en la enfermedad glaucomatosa, se detecta un incremento significativo de células de la microglía y macrófagos CD11b^{+} en la retina (184) (ver figura 16).

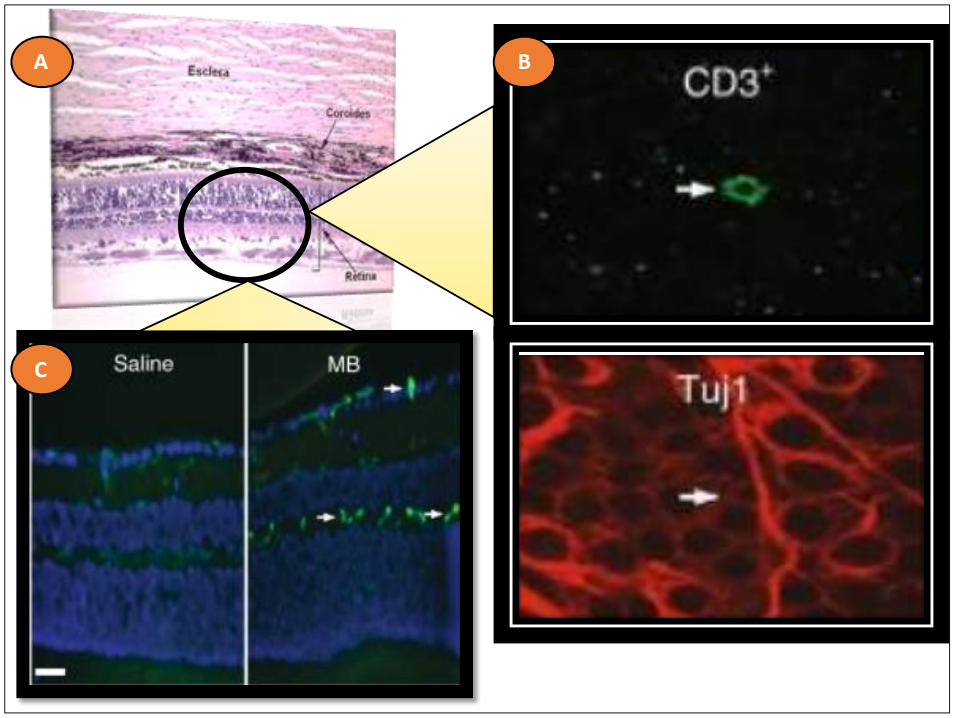


Figura 16: **Tipos celulares encontrados en la enfermedad glaucomatosa**. **A)** Histología del segmento posterior del ojo: localización de esclera, coroides y retina; **B**) Inmunohistoquímica de retina de ratones con HO. Marcador general de células TCD3^{+} (verde) y CGRs Tuj1 (rojo). Detección de infiltración de células T en la capa de células ganglionares y marcaje de CGRs (rojo) y **C)** Secciones de retina marcadas con anti-CD11b^{+} (verde; flecha), grupo control (Saline) y grupo con HO inducida por inyección de microperlas (MB=microbead). **Fuente**: *Modificado* de (184).

Con la activación de las células T, se libera una serie de sustancias neurotóxicas que dañan las CGRs, además de producir anticuerpos contra diversas proteínas neuronales, lo que induce cambios degenerativos severos (185) y activación del sistema de complemento (186). a presencia de este tipo celular es esencial para el desarrollo de la neurodegeneración glaucomatosa progresiva después de la elevación de la PIO. El proceso neurodegenerativo en el glaucoma se compone de dos

fases: la fase inicial, cuando la PIO está elevada, y la fase prolongada (progresiva), que ocurre después de que la PIO ha vuelto a su rango normal. Aunque la ausencia de células T y/o B no atenúa la fase inicial del daño neural, las células T son fundamentales en la fase prolongada, en la degeneración axónica de las CGRs (184). En la retina glaucomatosa, se encuentran dispersas subpoblaciones de linfocitos T infiltrantes en la capa de CGRs, principalmente linfocitos TCD4+, sin que se describa la presencia de $TCD8^{+}$ (184). La no expresión de linfocitos $TCD8^{+}$, puede estar atribuida a la baja expresión de moléculas MCH-I en la retina neural, no siendo detectados por los linfocitos T citotóxicos (139). Sin embargo, las células $TCD4^{+}$ se desarrollan en dos subtipos principales de células conocidas como células Th1 y Th2 (184,187).

La concentración de citoquinas asociada a la neuropatía óptica sugiere un desequilibrio en la producción de citoquinas Th1/Th2 en la cámara anterior, desempeñando un papel importante en el mecanismo del glaucoma (188) ya que pueden estar implicadas en el daño o protección de las CGRs (113,188). El equilibrio entre las funciones Th está mediado por Th3, que regula la transición de Th1 a Th2 mediante IL-10 y TGF-β (189). Entre las citoquinas Th1 que están directamente asociadas al daño producido en las CGRs tanto en estudios *in vivo* como *in vitro* está el TNF-α, mientras que IL-6 es la única citoquina Th2 que se ha informado que muestra resultados similares (188,190). Así como se observa activación de las células $TCD4^{+}$ e n la capa de CGRs en presencia de PIO elevada, también se detecta la infiltración de este tipo celular a nivel sistémico en el bazo y en los ganglios linfáticos de drenaje ocular. En contraste con lo observado en la retina, la PIO elevada es capaz de inducir una mayor reactividad sistémica de las células T, sin mostrar preferencia por un subconjunto específico de células $TCD4^{+}$, expresando tanto Th1, Th17, Th2 como Treg (184) (ver figura 17).

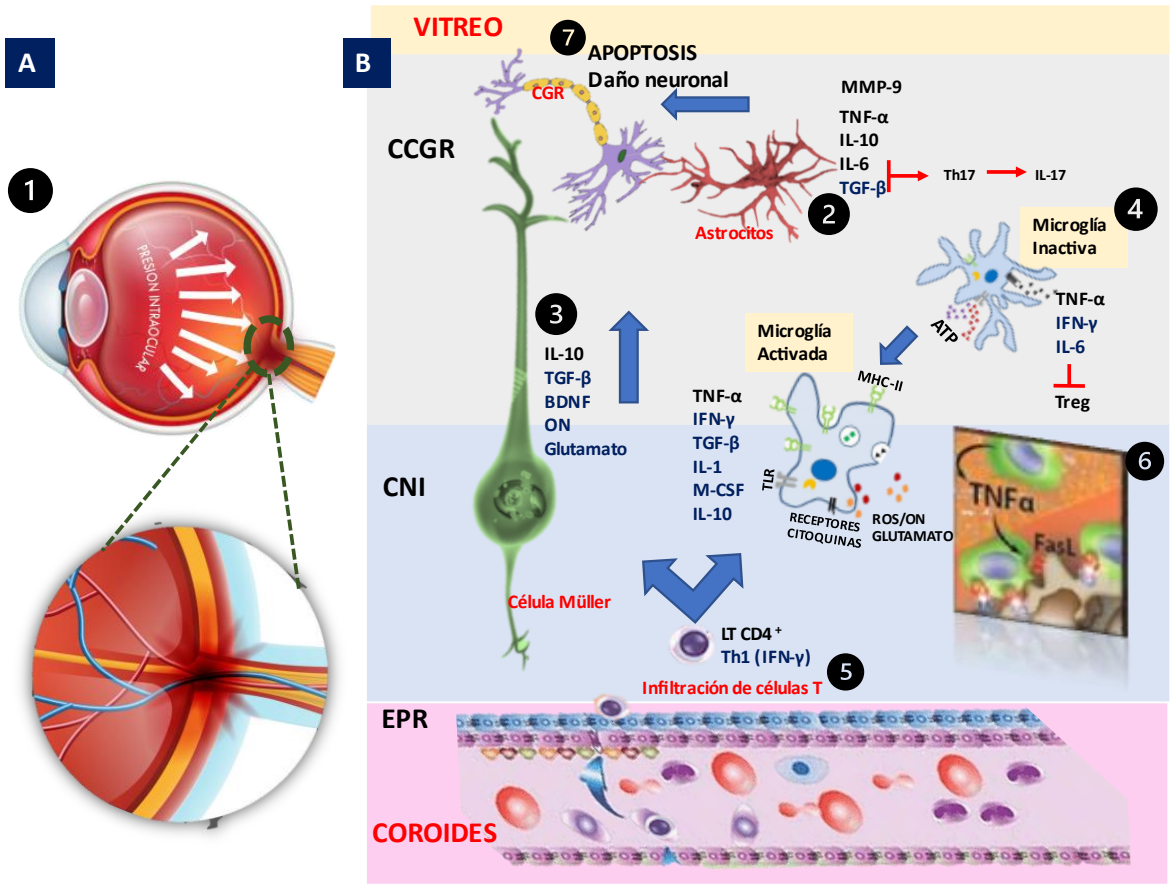


Figura 17: **Esquema representativo de la neuro inflamación en el segmento posterior e inducción de muerte celular**. **A)** Anatomía del ojo: **1)** El incremento de la PIO causa una alteración en retina y nervio óptico. **B)** Los cambios producidos en la retina son detectados por las células gliales; **2)** Los astrocitos detectan alteraciones en la retina secretando tanto citoquinas antinflamatorias como proinflamatorias y metaloproteinasas; **3)** Conjuntamente, ocurre la activación de las células de Müller. Estas células disminuyen la secreción de factores neurotróficos y aumentan la secreción de citoquinas, glutamato y ON en el medio; **4)** La microglía inactivada, en su forma ramificada, recibe estímulos a través de receptores tipo Toll y receptores de citoquinas, secretando citoquinas proinflamatorias y antinflamatorias. La microglía detecta alteraciones en el microambiente, y se activa a su forma ameboide. Al ser activada, expresa una mayor cantidad de HMC-II en su superficie y secreta productos tanto citoquinas antinflamatorias como proinflamatorias, agentes oxidantes y aminoácidos excitatorios intentando parar la respuesta inflamatoria producida; **5)** Como resultado de la activación crónica de las células gliales y un ambiente neuro inflamatorio, ocurre infiltración de linfocitos $TCD4^+$ a través del EP, secretando citoquinas proinflamatorias aumentando el proceso neurodegenerativo; **6)** La secreción aumentada de TNF-α por las células gliales, activa principalmente los receptores de Fas/FasL presentes en las CGRs y células de la microglía induciendo la apoptosis celular y **7)** La activación constante de las células gliales causa un daño irreversible de las CGRs, produciendo apoptosis. **Fuente**: *Modificado a partir de: https://www.freepik.es/vector-premium/esquema-vectores-glaucoma_3857641.htm; https://www.researchgate.net/publication/309120956_El_papel_de_la_microglia_en_la_senalizacion_neuroinflamatoria_y_la_respuesta_neuroinmune/figures?lo=1*

1.4.5 Citoquinas pro y antinflamatorias asociadas a la neurodegeneración glaucomatosa

- **Visión general: citoquinas**

Las citoquinas son proteínas secretadas por las células del sistema inmune en respuesta a microorganismos y otros antígenos (102). Actúan como mensajeras, llevando información de una célula a otra. En el sistema nervioso central y el ojo, son secretadas por diversos tipos de células, incluidas las neuronas, las células de la microglía, las células estrelladas, las células endoteliales, los astrocitos y las células Th (168,191). Estas citoquinas participan tanto en la inmunidad innata como en la adquirida, actuando como reguladoras de respuestas fisiológicas y fisiopatológicas (101). Cumplen funciones como: a) acción pleiotrópica (actúan en diferentes tejidos); b) redundancia (diferentes citoquinas inducen el mismo efecto) tanto en el sistema inmune innato como en el adquirido; c) sinergismo (se potencian entre sí); y d) antagonismo (efectos inhibitorios) (104). Además, pueden actuar de forma autocrina (sobre la misma célula que las produce), paracrina (sobre una célula vecina) o endocrina (de efecto sistémico) mediante receptores específicos presentes en las células sobre las que actúan (101). También son capaces de estimular el crecimiento y la diferenciación de linfocitos y monocitos hacia células efectoras involucradas en la eliminación de microorganismos, participando en los procesos inflamatorios (102).

Las células diana de las citoquinas suelen estar adyacentes a las células secretoras o ser las mismas células secretoras; por tanto, las citoquinas no requieren de fluidos corporales para su transporte y solo necesitan alcanzar concentraciones locales efectivas. Los niveles de expresión de citoquinas suelen ser bajos, con una expresión rápida y masiva solo en respuesta a la inmunoestimulación, deteniéndose rápidamente cuando la respuesta se completa. La vida media de las citoquinas es extremadamente corta, y sus niveles de expresión varían a lo largo del tiempo, lo que dificulta su detección clínica y el análisis de datos (192). Además, la respuesta celular presente en la inflamación ocular a menudo es difícil de detectar debido a las muestras pequeñas y de bajo contenido celular (193). Para el análisis de citoquinas, se recomienda la técnica de citometría de flujo Multiplex, ya que permite determinar células inflamatorias o neoplásicas con alta fiabilidad y rendimiento. También es capaz de medir múltiples citoquinas con una muestra pequeña, destacándose por la posibilidad de utilizar marcadores de superficie para identificar el tipo y proporción de células presentes, lo que facilita la identificación del tipo de respuesta celular (193).

- ***Tipos de citoquinas implicadas en el glaucoma***

Se han detectado varias citoquinas en el humor acuoso de pacientes glaucomatosos, incluidas IL-6, IL-8, TGF-β y TNF-α, las cuales presentan cambios en su expresión ocular y están asociadas con una reacción inmune y/o una inflamación crónica en la malla trabecular (MT) o en el segmento

anterior (168,194). Estas citoquinas poseen actividad angiogénica, estimulan la proliferación de células gliales, e inducen la proliferación fibroblástica y la respuesta antinflamatoria (101). En la patología glaucomatosa, es posible observar adherencias entre la MT periférica, la córnea y el iris, iniciando un proceso inflamatorio. La inflamación asociada a sinequias puede causar adherencias permanentes entre estas estructuras del ángulo iridocorneal, conduciendo al cierre de este. Además, cualquier cambio en la dinámica acuosa, incluyendo la presencia de células y proteínas, puede formar sinequias posteriores (iris/lente), lo que lleva al bloqueo pupilar. Por tanto, estas citoquinas podrían desempeñar un papel en la inflamación subclínica que provoca el cierre permanente del ángulo (195).

- **Factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α)**

Los principales inductores del TNF-α son los fagocitos mononucleares activados por lipopolisacáridos, aunque también puede ser secretado por células T, células NK y mastocitos activados (101,196). Esta citoquina puede actuar como mediadora tanto de la inmunidad innata como adaptativa, de manera paracrina o autocrina, en los leucocitos y células endoteliales, alterando tanto la morfología como el comportamiento de estas células (196). Se considera que en la compleja cascada de mediadores de la inflamación, el TNF-α juega un papel prominente en el glaucoma, tanto por ser una de las citoquinas que se producen más precozmente como por su capacidad para actuar sobre casi todas las células, ya que todas ellas expresan receptores para TNF-α (197).

Intraocularmente, el TNF-α es capaz de: a) inducir el reclutamiento de leucocitos hacia el ojo en las fases iniciales de la enfermedad, mediante el incremento de la adhesión leucocitaria al endotelio y la producción de quimioquinas; b) inducir la maduración de células dendríticas, aumentando su capacidad para presentar antígenos a los linfocitos; c) activar macrófagos; d) activar la función efectora de los linfocitos T infiltrantes; y e) incrementar la apoptosis de células residentes oculares y de células infiltrantes (198). Sin embargo, es posible observar algunos efectos sistémicos cuando se secretan grandes cantidades de esta citoquina, como: a) inducción de fiebre mediante su acción en ciertas regiones del hipotálamo; b) inhibición de la división de células madre en la médula ósea; c) aumento de la síntesis de proteínas séricas en los hepatocitos; d) activación del sistema de coagulación; y e) estimulación de la secreción de IL-1 e IL-6 a la circulación, actuando sobre las células endoteliales vasculares (196).

La molécula de TNF-α se encuentra normalmente en ojos sanos, en las células del epitelio pigmentario del iris, el cuerpo ciliar, la microglía y los astrocitos de la retina. Estas células expresan receptores tipo I y II para TNF-α, lo que permite mantener los niveles de esta citoquina dentro de valores no patológicos; a menos que se desarrolle hipoxia, el aumento de los niveles de TNF-α no es suficiente para activar la vía de las caspasas y llevar a la apoptosis de las CGRs (199). Esta citoquina se encuentra aumentada en el humor acuoso de pacientes con glaucoma primario de ángulo abierto (GPAA). Además de su elevada concentración en la cámara anterior, el TNF-α también está presente en altos niveles en el nervio óptico y la retina de ojos glaucomatosos humanos, desempeñando un papel vital en el daño de las CGRs (200,201).

- **Interferón Gamma (IFN-γ)**

El IFN-γ es una citocina pleiotrópica implicada en los mecanismos inmunopatogénicos de varias enfermedades inflamatorias de etiología autoinmune o infecciosa. Sin embargo, su papel exacto sigue siendo motivo de debate (202). Aunque el IFN-γ generalmente no se encuentra en el ojo, su presencia intraocular está relacionada con procesos inflamatorios. En circunstancias normales, la producción de esta citocina en el ojo es suprimida activamente por varios mecanismos. Tanto el TGF-β como la prostaglandina E2 presentes en fluidos intraoculares suprimen los efectos del IFN-γ (203). En modelos de ratas transgénicas, se ha demostrado que la exposición crónica de las células oculares al IFN-γ resulta en la muerte apoptótica de las CGRs, la formación de pliegues retinianos y la activación de genes proinflamatorios. Además, se ha observado que la secreción constitutiva de IFN-γ en el ojo de la rata predispone al desarrollo de uveítis anterior grave y a la inducción de procesos degenerativos en la retina que deterioran la agudeza visual (202). No obstante, para que el IFN-γ tenga un impacto en un entorno fisiológico normal, las células clave que producen esta citocina (T o NK) deberían atravesar la barrera hematorretiniana y estar activadas para causar disfunción ocular.

- **Factor de Crecimiento Transformante Beta (TGF- β)**

El TGF-β es una citocina sintetizada por linfocitos (Th2 y Th3) (204), macrófagos y células dendríticas, cuya expresión regula de manera autocrina o paracrina la diferenciación, proliferación y activación de estas células (102,205). Generalmente, el TGF-β1 posee propiedades pleiotrópicas en el contexto de la respuesta inmune durante el desarrollo de infecciones; sin embargo, los mecanismos de acción y regulación de esta citocina aún no se comprenden completamente (205).

Las isoformas TGF-β1, 2 y 3 comparten una alta homología de secuencia de aminoácidos, tienen distintos patrones de expresión y sus funciones son mediadas por los mismos receptores (206). Tanto el TGF-β1 como el TGF-β2 se encuentran elevados en el humor acuoso de personas con GPAA. Estas citocinas presentan propiedades pro y antiinflamatorias, lo que sugiere que un aumento en su concentración podría reflejar un empeoramiento de la enfermedad o una respuesta compensatoria protectora de las células en la cámara anterior (207). En el glaucoma, el TGF-β1 se expresa ampliamente en la MT, el humor acuoso, la cámara anterior y las células gliales (175). Diversos estudios han reportado niveles elevados de TGF-β2 en la cabeza del nervio óptico de pacientes con glaucoma (208,209). Se postula que el TGF-β aumenta la resistencia al flujo al alterar la homeostasis de la matriz extracelular y la contractilidad celular en la MT a través de interacciones con otras proteínas y moléculas de señalización (210).

El aumento de TGF-β se debe a la pérdida de la barrera hematoocular, lo que incrementa su concentración derivada del plasma en el ojo. Esta citocina en el humor acuoso reduce la producción de enzimas responsables de la degradación de la matriz extracelular, suprime la activación de macrófagos y células de la microglía, regula la proliferación y diferenciación de células T, y participa en la fibrosis e inducción de la expresión de varios componentes de la matriz extracelular (200,211). El TGF-β también promueve la transdiferenciación de fibroblastos en miofibroblastos, aumentando la rigidez de la MT (212), así que mayores cantidades de TGF-β activo pueden contribuir aún más al aumento de la rigidez de este tejido (213). El TGF-β en su forma activa también es capaz de inducir o amplificar los cambios reactivos en los astrocitos en el nervio óptico como consequencia de la rigidez de la MT (213) debido el aumento de la expresión con la reactivación glial, sugeriendo un papel importante de esta citoquina en la patogénesis de esta enfermedad (175). En un estudio con ratones de HO, se observó que el uso de dexametasona activaba esta citocina en el humor acuoso y la MT, indicando su papel central en el aumento de la PIO (76). Es esencial investigar si estos cambios se replican en otras especies antes de trasladar los hallazgos a la clínica humana.

- **Interleucina - 10 (IL-10)**

La IL-10 es una potente citocina antiinflamatoria que desempeña un papel crucial en la respuesta antiinflamatoria (214). Esta citocina se ha asociado con la susceptibilidad al GPAA. Estudios en varias etnias han revelado que los polimorfismos del promotor de IL-10 se correlacionan con una baja producción de esta citocina en pacientes (215). La IL-10 inhibe la secreción de citoquinas de las células Th1 (216). Los monocitos son la mayor fuente de IL-10 y otras células

productoras de esta citocina incluyen las células T (especialmente, las células TCD4^{+} reguladoras que expresan también CD25 y FOXP3). La IL-10 regula la expresión linfocitaria de IL-4, IL-5 e IFN-α. La expresión de esta citocina tiene efectos inhibitorios y supresores en la función proinflamatoria de las células presentadoras de antígeno (214,217).

- **Interleucina - 6 (IL-6)**

La IL-6 es la principal citocina inductora de la producción de proteínas de fase aguda de la inflamación. Es sintetizada por macrófagos, células endoteliales vasculares, fibroblastos, algunas células Th2 activadas, y otras células en respuesta a la IL-1 y al TNF-α. En la retina, esta citocina es producida por astrocitos y microglía. Entre sus funciones se encuentran: a) estimular la síntesis de {-V Cproteínas plasmáticas en hepatocitos; b) actuar como factor de crecimiento de células B en las fases finales de su diferenciación; y c) coestimuladora de las células gliales (196). La IL-6 está involucrada en una variedad de patologías del sistema nervioso central que incluyen lesión, infección y neurodegeneración, afectando tanto a las neuronas como a las células gliales (218). Su bloqueo ha mostrado resultados prometedores en el tratamiento de afecciones autoinmunes (101).

Dado que la IL-6 es un mediador vital del aumento de la permeabilidad vascular y la disfunción endotelial, su elevación podría estar vinculada a la vasculopatía del iris y la degradación de la barrera hematoacuosa, características del glaucoma (219). En experimentos *in vitro*, se observó que el nivel de IL-6 aumenta en el medio acondicionado de las células de la MT después de la estimulación con TGF-β2, sugiriendo que el TGF-β regula e induce la expresión de IL-6 en la MT (212). En este contexto, se ha propuesto que la IL-6 potencialmente reprime la señalización del TGF-β2, principalmente suprimiendo la fibrosis inducida por esta citocina (211). En contraste, otros estudios demostraron que la deficiencia de IL-6 es capaz de proteger las CGRs de la apoptosis inducida por aumento de presión, apoyando la idea de que la disminución de ésta citoquina tiene efecto neuroprotector en modelos de excitotoxicidad del glutamato y aplastamiento del nervio óptico y que la presencia de IL-6 durante la fase temprana postraumática, al menos en ratones que son susceptibles al desarrollo de enfermedad autoinmune, tiene un efecto negativo en la supervivencia neuronal (190). Sin embargo, existen muy pocos estudios a respecto del impacto de esta citoquina en la degeneración glaucomatosa *in vivo* (220,221).

- **Interleucina - 8 (IL-8)**

La IL-8 es una quimiocina proinflamatoria, funciona como inductora de quimiotaxis de neutrófilos y mediadora de la infiltración de linfocitos (222). Se produce de forma endógena en la retina, el nervio óptico (195) y las células de la MT, lo que la convierte en una fuente local de esta citocina. Aunque algunos estudios sugieren que la IL-8 protege a las neuronas, sus niveles elevados suelen asociarse con eventos negativos, especialmente en la neuroinflamación (222). La significativa correlación positiva entre la IL-8 y la PIO observada en un estudio aún no se ha aclarado. Sin embargo, investigaciones sugieren que la IL-8 podría regular la resistencia al flujo de salida del humor acuoso mediante la remodelación de la matriz extracelular y la fibrosis en la MT de pacientes con glaucoma (200). Otra investigación ha reportado un incremento de la IL-8 correlacionado con la edad de pacientes glaucomatosos. Esto se debe a que los fibroblastos de la piel humana en personas mayores producen mayores cantidades de IL-8 comparados con individuos jóvenes durante la respuesta inflamatoria. Estos hallazgos sugieren que hay un incremento gradual en la producción de citoquinas proinflamatorias con la edad, conduciendo eventualmente a un estado de inflamación crónico en individuos con esta patología (172).

La IL-8 no solo recluta macrófagos sino que también promueve la proliferación de células progenitoras mesenquimales fibrogénicas que conducen a la generación de lesiones fibróticas (223). La IL-8 generalmente ejerce su función a través de la unión a los receptores de quimiocina (CXC1) (CXCR1) y (CXCR2), importantes dianas terapéuticas en enfermedades inflamatorias. Se ha informado que estos receptores se expresan tanto en la retina humana como en la de conejos. Además, se observaron inmunorreacciones de CXCR1 y CXCR2 en las fibras nerviosas de las CGRs y en las células de Müller cultivadas de vitreorretinopatía proliferativa sugiriendo su participación en el proceso de gliosis(222). Existe una correlación entre los niveles de TGF-β e IL-8, lo que sugiere que las redes de citoquinas juegan un papel importante en la elevación de la PIO en el glaucoma (200). La producción excesiva de IL-8 en el nervio óptico y la retina puede inducir la muerte de CGRs y provocar daño axonal (195). La apoptosis inducida en las CGRs por IL-8 ocurre debido a la reducción de Bcl-2 (actividad antiapoptótica) y el aumento de Bax (promotor de la muerte celular) y caspasa-3 (ejecutor de la apoptosis) (222).

1.5 LAS CÉLULAS MADRE

Las células madre poseen una serie de propiedades que las distinguen de otros tipos celulares, lo que les ha conferido una gran importancia tanto en investigación como en la clínica en los últimos

años. Estas células presentan una capacidad de autorreplicación y diferenciación, dando origen a uno o más tipos o linajes celulares (224). Por lo tanto, el concepto de célula madre abarca un amplio rango de células con diferentes capacidades de proliferación y diferenciación (225).

La clasificación de este tipo de células se realiza en función de su capacidad de diferenciación y su origen. Según su potencial de diferenciación, se clasifican en: a) Totipotenciales: capaces de diferenciarse en cualquier tipo celular, originando un organismo completo, incluyendo el tejido germinal; b) Pluripotenciales: pueden dar lugar a células procedentes de las tres capas embrionarias; c) Multipotenciales: derivan de una de las capas embrionarias y pueden originar los tipos celulares de un órgano o tejido; y d) Unipotenciales: se diferencian en un único tipo celular. En cuanto a su origen, se dividen en: a) *Células madre embrionarias*, que proceden de embriones (blastocistos) antes de su implantación en el útero; b) *Células madre germinales*, que derivan de la cresta gonadal del feto; y c) *Células madre adultas*, que se originan a partir de tejidos adultos maduros (23,225,226). Las células madre adultas ofrecen algunas ventajas en comparación con las embrionarias. En los trasplantes, las células adultas evitan la respuesta inmune, la diferenciación celular es más sencilla y su extracción es más accesible. No obstante, también presentan desventajas, como una fuente celular limitada, posibles cambios genéticos en las células autólogas que podrían contraindicar su uso y su naturaleza multipotente (227,228).

El hecho de que las células madre adultas se obtengan de individuos adultos elimina las objeciones éticas y legales asociadas con el uso de otros tipos celulares, lo que las convierte en candidatas idóneas para su uso clínico. De hecho, numerosos ensayos clínicos están actualmente en curso utilizando este tipo celular (226). La principal fuente de células madre adultas es la médula ósea, que contiene no solo células madre hematopoyéticas, sino también una subpoblación de células mesenquimales que pueden diferenciarse in vitro e in vivo en osteoblastos, condroblastos, fibroblastos, adipocitos y mioblastos, denominadas MSCs (229–231).

1.5.1 Células Madre Mesenquimales (MSCs)

Las células madre mesenquimales (MSCs), también conocidas como células madre estromales, fueron identificadas por primera vez en los años 60 por Friedenstein y sus colaboradores, quienes observaron la capacidad de formar hueso a partir de una población de progenitores de médula ósea en un modelo de rata. Las MSCs derivan de la capa embrionaria del mesodermo, por lo que son capaces de diferenciarse en diversos linajes celulares. Esta plasticidad las hace idóneas para la reparación y regeneración de tejidos dañados (232). Pueden obtenerse de

esta misma capa embrionaria o de otros tejidos como hueso, cartílago, músculo, estroma medular, cordón umbilical, ligamentos, grasa y otros tejidos conectivos (233,234). La capacidad de diferenciación de estas células no parece limitarse a estos tejidos, ya que también se ha demostrado su capacidad de diferenciarse en células de otras capas, como tejido neurogénico, células pancreáticas o células hepáticas (23). Existen diferencias entre las MSCs obtenidas de distintos tejidos; en esta investigación, se abordarán únicamente las células mesenquimales derivadas del cordón umbilical.

Las células derivadas del cordón umbilical se consideran una de las principales fuentes de MSCs para aplicaciones clínicas y de investigación. Desde un punto de vista práctico, es relativamente fácil aislar un gran número celular después de varios pases y una amplia expansión in vitro. Es importante destacar que, en comparación con las MSCs de otras fuentes, las WJ-MSCs (células mesenquimales de la gelatina de Wharton) tienen una mayor capacidad de proliferación, una vida útil más prolongada y un mejor potencial de diferenciación, sin mostrar signos de senescencia en los pasajes en serie (235). Además, estas células perinatales se asemejan a las células madre embrionarias, pero conservan muchas propiedades de las células madre mesenquimales adultas, expresando niveles más bajos de marcadores pluripotentes que las células madre embrionarias, lo que sugiere que son altamente multipotentes en lugar de pluripotentes (236).

Las células estromales aisladas de la gelatina de Wharton se han descrito como la mejor fuente de MSCs entre los diversos compartimentos del cordón umbilical (estroma, venas, arterias, revestimiento y subamnios) (ver figura 18), siendo capaces de conservar las mismas propiedades a lo largo de toda la longitud del cordón (237). La gelatina de Wharton es un tejido conectivo ubicado dentro del cordón umbilical compuesto en gran parte por células madre mesenquimales y componentes de la matriz extracelular, que incluyen colágeno, sulfato de condroitina, ácido hialurónico y proteoglicanos sulfatados (236). Estas células ofrecen la mejor utilidad clínica debido a su menor contaminación celular, la posibilidad de generarlas en grandes cantidades con un cultivo mínimo, su rápida derivación y fácil estandarización, su riqueza en características de troncalidad y su alto potencial de diferenciación (237). Además, las WJ-MSCs presentan una mayor expresión de factores neurotróficos y una tendencia espontánea hacia la diferenciación de linaje neural en comparación con las MSCs aisladas de tejidos adultos (238,239). El uso de WJ-MSCs en modelos animales ha demostrado seguridad y eficacia en algunos tratamientos, dado que la terapia con estas células parece disminuir el tamaño de la lesión, promover la regeneración neuronal y axonal,

aumentar la vascularización local (240) y presentar un efecto antifibrótico (234,238), lo que evidencia su actividad paracrina y endocrina (237).

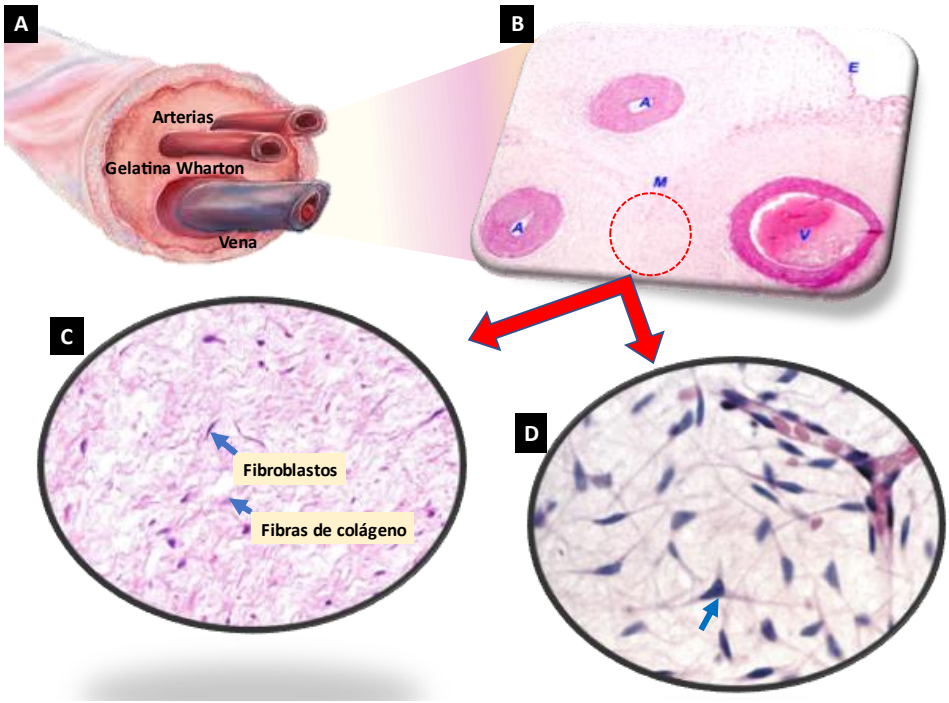


Figura 18: Anatomía del cordón umbilical. **A)** Gelatina de Wharton localizada entre las arterias y la vena; **B)** Corte histológico teñido con hematoxilina eosina (2x). Presencia de substancia amorfa en tejido conjuntivo mucoso y la superficie del cordón recubierta por un epitelio; **C)** La escasez de fibras colágenas y la gran hidratación del conjuntivo mucoso, son responsables de la consistencia blanda y el aspecto gelatinoso del cordón umbilical y **D)** Flecha: Células mesenquimatosas en el cordón umbilical. **A**: arterias; **V**: Vena; **E**: Epitelio y **M:** tejido conjuntivo mucoso. **Fuente:** *Modificado de Laboratorio de biología Interactiva (UCSC), https://bilab.ucsc.cl/tejido-conectivo-mucoso-gelatina-de-wharton-en-cordon-umbilicaltejido-conectivo-mucosop/).*

Dada la relevancia clínica que están adquiriendo las MSCs, la Sociedad Internacional de Terapia Celular estableció algunos criterios para que la célula se defina como célula madre:

a) Las células deben ser adherentes al plástico cuando se encuentran en cultivo.

b) Expresar los antígenos CD73 (nucleotidasa presente en la cara externa de la membrana plasmática)(241), CD90 (proteína de superficie que interviene en las interacciones célula-matriz extracelular o célula-célula en procesos inflamatorios)(242) y CD105 (proteína que forma parte del complejo del receptor del factor de crecimiento transformante β (TGF-β), regula la adhesión, la migración, la permeabilidad, la apoptosis y la proliferación)(243).

c) No expresar los antígenos hematopoyéticos como CD34 (marcador de células madre hematopoyéticas relacionadas con la morfogénesis y la migración de las células del sistema inmune) (244), CD45 (marcador pan leucocitario capaz de regular la señalización del receptor antigénico en las células inmunes, especialmente en linfocitos T y B) (245), CD14 o CD11b (marcadores de monocito/macrófago), CD79a o CD19 (marcadores de linfocitos B) y HLA-DR o HLA de clase II (Antígeno Leucocitario Humano, responsable de la presentación de antígenos al sistema inmune para la activación de linfocitos T) (246).

Es importante señalar que estos criterios han sido establecidos únicamente para células humanas. En modelos animales, aún no se han definido criterios mínimos universales para la identificación de MSCs. No obstante, la caracterización de MSCs en ratones las ha identificado como positivas para CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD106 y Sca-1, y negativas para Ter-119, CD11b, CD31 y CD45 (247–249). En conejos, aunque existen pocos estudios, se ha demostrado que estas células son positivas para CD44, CD29, actina muscular alfa, vimentina y Sox2 (250,251).

d) Deben ser capaces de diferenciarse *in vitro* en osteoblastos, adipocitos y condrocitos bajo condiciones adecuadas en cultivo (246). El proceso de diferenciación a un linaje está determinado por la presencia de factores específicos en el microambiente en el que se encuentran las MSCs. Este microentorno vendrá marcado de forma natural por el tejido en el que se encuentren las células en el momento de su diferenciación y por las señales que estén recibiendo (252,253) (ver tabla 1).

Tabla 1: Diferenciación celular las MSCs en distintos microambientes. La diferenciación puede ser inducida y controlada *in vitro* mediante la adición de determinados factores al medio de cultivo.

Diferenciación	Medios Cultivo	Observación del proceso	
Adipogénica	Dexametasona Isometilbutilxantina Indometacina	Vacuolas lipídicas en el citoplasma de las células	
Osteogénica	• Ácido ascórbico-2-fosfato • β-glirerolfosfato • Factor de crecimiento de fibroblastos β	Depósitos de minerales (calcio y fosfato)	
Condrogénica	• Ácido ascórbico • Insulina-transferrina-selenio • TGF-β • Proteínas morfogenéticas óseas	Matriz extracelular rica en proteoglicanos	

Las MSCs pueden aplicarse en distintos tejidos y diferenciarse a través de diversas vías de señalización. Estas señales se inducen por daños en el tejido, ya sean inflamatorios o apoptóticos. Además, estas células presentan la capacidad de secretar factores solubles, modificando así la

funcionalidad del microambiente y reparando el daño tisular. Entre los factores secretados por este tipo de células se incluyen el TGF-1, IL-1β, IL-3, IL-6 e IL-7, que actúan disminuyendo la inflamación y la respuesta inmune (247). La liberación de citoquinas inflamatorias en los tejidos dañados conlleva la producción, por parte de las MSCs, de una gran cantidad de factores de crecimiento que organizan células endoteliales, fibroblastos y otras células madre para promover la regeneración y reparación de tejidos mediante la angiogénesis, la secreción de metaloproteinasas y matriz extracelular, así como la diferenciación celular (254). Las MSCs también presentan propiedades inmunomoduladoras, principalmente debido a su efecto paracrino o endocrino, lo que les permite suprimir algunas funciones de linfocitos T, B y células NK, y alterar la función de las células dendríticas (255). Conjuntamente, producen una variedad de factores de crecimiento, citoquinas y quimioquinas que juegan un papel crucial en su inmunomodulación y migración (256).

Numerosos estudios, tanto in vitro como *in vivo* en modelos animales, han investigado los mecanismos de acción de estas células y su posible aplicación clínica debido a su capacidad inmunosupresora (250,257). Las MSCs son consideradas poco inmunogénicas, pues no expresan moléculas coestimuladoras como CD40, CD80 o CD86, tampoco el HMC-II (258,259). A pesar de esta característica, se está considerando el uso de terapias con MSCs en el tratamiento de enfermedades inmunosupresoras. Se sabe que tanto el IFN-γ como el TNF-α, que actúan de manera sinérgica, están directamente relacionados con esta propiedad de las MSCs. El IFN-γ puede activar las propiedades inmunosupresoras de las MSCs cuando es secretado por linfocitos activados o en un ambiente inflamatorio (260,261).

Estas células también pueden actuar tanto en la respuesta inmune innata como en la adquirida. En la respuesta innata, las MSCs inducen un fenotipo tolerogénico y una respuesta inmune Th2 antiinflamatoria, mediada por la secreción de IL-10 (262), debido a la inhibición de la maduración de las células presentadoras de antígenos (CPA) mediada por IL-6 y prostaglandina E2 (263,264), lo que impide la presentación de antígenos y la secreción de IL-12 y TNF-α (265). La prostaglandina E2 también puede modificar el equilibrio entre la respuesta Th1 y Th2 Las CPA inmaduras pueden inducir la proliferación de células T reguladoras (Treg) (267) e inhibir la proliferación de linfocitos $TCD4^+$ y $TCD8^+$, suprimiendo así la respuesta inmune (265). En relación con la respuesta inmune adaptativa, las MSCs son capaces de inhibir la migración, proliferación y producción de anticuerpos por parte de los linfocitos B (268,269). También inhiben la liberación de IFN-γ y la citotoxicidad de los linfocitos T (261,270). Algunos estudios indican que las MSCs atraen a

los linfocitos mediante factores quimiotácticos, que a su vez liberan citoquinas como TGF-β, IL-4, IL-10 e IL-6, desencadenando así el efecto inmunosupresor de las MSCs (260,261,271).

Las WJ-MSCs, derivadas del cordón umbilical, no son inmunogénicas por sí solas, ya que una única inyección de estas células inactivadas no induce una respuesta inmunitaria detectable. Sin embargo, cuando se inyectan en una región inflamada o se estimulan con IFN-γ antes de la inyección, pueden volverse inmunogénicas (272,273). La administración sistémica de estas células generalmente resulta en una disminución de la respuesta Th1 y Th17, responsables de la inflamación y la respuesta autoinmune, respectivamente, inhibiendo además la respuesta citotóxica (265,274,275).

Actualmente, se han desarrollado numerosos ensayos clínicos y aplicaciones potenciales relacionadas con el uso de células madre. En el campo de la oftalmología, se han reportado investigaciones sobre el empleo de diversos tipos celulares, incluyendo células endoteliales, células madre hematopoyéticas, mesenquimales de médula ósea, tejido adiposo y cordón umbilical, tanto para el tratamiento de enfermedades autoinmunes como inflamatorias y en la prevención del rechazo en trasplantes (276). Antes de avanzar con investigaciones en pacientes, la comunidad científica ha reconocido la necesidad de realizar más estudios experimentales que puedan resolver incógnitas responsables del "fracaso" de esta prometedora terapéutica, debido al limitado conocimiento sobre su biología (226).

1.5.2 Neuroprotección con células madre

El objetivo principal del tratamiento antiglaucomatoso es mantener una función visual adecuada y una buena calidad de vida. Es crucial evitar tratamientos de reducción de la PIO excesivos e innecesarios, así como prevenir la incapacidad visual en pacientes con riesgo de desarrollar glaucoma. Aunque existen diversas formas de glaucoma, los cambios histopatológicos que ocurren en la papila comparten un denominador común: la muerte neuronal. Hasta la fecha, la única intervención que ha demostrado frenar el avance del daño glaucomatoso es la disminución de la PIO (277). La pérdida de visión en el glaucoma es consecuencia de la muerte de las CGRs las cuales no pueden regenerarse. Para detectar la pérdida de campo visual, es necesario que se produzca un daño significativo en la retina, lo que dificulta la detección precoz y el tratamiento de la enfermedad (278). Por ello, todos los esfuerzos que conduzcan a un diagnóstico temprano del glaucoma permitirán un tratamiento en fases iniciales de la enfermedad y, por lo tanto, serán más eficaces en la prevención de la progresión hacia la ceguera (35). En este contexto, la terapia celular

emerge como una estrategia terapéutica alternativa, cuyo objetivo principal es reparar y/o retrasar la evolución del daño causado por la elevación de la PIO.

Las MSCs han demostrado una neuroprotección significativa en varios modelos degenerativos del sistema nervioso central (279). Los avances recientes en biología regenerativa ocular sugieren la posibilidad de futuros tratamientos con células madre para restaurar la visión en pacientes con glaucoma. El progreso en biología celular ha permitido la diferenciación de células madre murinas y humanas en diversos tipos de células oculares de interés (280). Sin embargo, la falta de modelos animales predictivos limita las oportunidades para estudiar el glaucoma y evaluar el éxito o fracaso de nuevas terapias durante los ensayos clínicos (281).

Aunque tradicionalmente se consideraba que las MSCs tenían propiedades inmunosupresoras, se ha descubierto que poseen una plasticidad funcional que les permite modular la respuesta inmune de manera bidireccional, dependiendo del entorno. En condiciones de baja inflamación, las MSCs pueden secretar moléculas y factores que estimulan la respuesta inmune, promoviendo la regeneración y reparación de tejidos (282). Esta capacidad de las MSCs para adaptarse al microambiente y modular la respuesta inmune tiene importantes implicaciones terapéuticas en diversas condiciones médicas. En determinadas circunstancias, las MSCs no ejercen su función inmunosupresora y, en su lugar, incrementan la respuesta inmune. Por ejemplo, en presencia de altos niveles de citoquinas inflamatorias, las MSCs ejercen una fuerte acción inmunosupresora; sin embargo, en niveles bajos de IL-10, estos efectos se suprimen (283). Así, el ambiente inflamatorio determina el efecto inmunomodulador de las células.

El efecto inmunopotenciador podría deberse a que las MSCs actúan como células presentadoras de antígenos (CPA); en condiciones de bajas concentraciones de IFN-γ, se produce un incremento en la expresión de moléculas de HMC. No obstante, a medida que aumentan las concentraciones de IFN-γ, las MSCs pierden progresivamente la función presentadora y la capacidad de inducir una respuesta de células T (284). Por ello, se sugiere que, al inducir un ambiente inflamatorio a nivel ocular, el uso de WJ-MSCs podría suprimir el efecto de ciertas citoquinas, caracterizando su efecto inmunosupresor y antiinflamatorio, lo cual contribuye a la neuroprotección en la enfermedad. Estudios en modelos experimentales de glaucoma describen la utilización de células diferenciadas de la MT y CGRs para obtener un efecto neuroprotector en la retina (278). Otros estudios indican que las MSCs derivadas de médula ósea (BMMSCs) podrían diferenciarse en células fotorreceptoras tras ser implantadas en la cavidad subretinal de ratas con degeneración hereditaria de la retina (285). Tanto estudios *in vitro* como *in vivo* con animales, han demostrado

que las BMMSCs pueden retrasar la apoptosis y la pérdida funcional de las células fotorreceptoras retinianas (286). Las WJ-MSCs, tienen propiedades similares a las BMMSCs, incluyendo la cinética de crecimiento, el fenotipo inmune y el potencial de diferenciación (287), además de no provocar una reactivación de linfocitos incompatibles y, suprimir la reacción de linfocitos mixtos y la respuesta de linfocitos proliferativos a los mitógenos (288).

Las MSCs también presentan la propiedad de pasar desapercibidas para el sistema inmunológico, lo que permite el trasplante de estas células entre especies diferentes (xenotrasplante) (289). Actualmente, existen estudios que proporcionan evidencia de la integración exitosa del uso de células xenogénicas en modelos animales para el tratamiento de diversas enfermedades humanas (280,290). Estos estudios demuestran los beneficios de las células para determinar el tráfico celular y la biodistribución (290). Ninguno de los estudios ha documentado rechazo inmune debido al uso de células en especies diferentes; por el contrario, reportan que las células derivadas de humanos no provocaron una respuesta inmunitaria en el sitio de aplicación, lo que se atribuye a las propiedades inmunosupresoras de estas células (288). Se ha demostrado que las MSCs pueden expresar una gran cantidad de factores neurotróficos, factores de crecimiento y citoquinas antiinflamatorias *in situ* después del trasplante. La secreción de estos factores parece conferir fuerte efecto neuroprotector en los modelos de isquemia como el observado con la utilización de estas células en inyecciones intravítreas en un modelo de HO (291). Los efectos terapéuticos del trasplante de células madre sobre el daño orgánico pueden basarse en la regulación a nivel genético y molecular (292).

2. HIPÓTESIS DEL TRABAJO

Se plantea que la aplicación intravítrea de células madre mesenquimales derivadas de la gelatina de Wharton (WJ-MSCs) inducirá un efecto neuroprotector en un modelo de HO, particularmente en el contexto del glaucoma. Se postula que las WJ-MSCs, a través de la liberación de factores de crecimiento y citoquinas, activarán las células endógenas del hospedador, promoviendo la neuroprotección del microambiente ocular. Este mecanismo podría estar mediado por las propiedades inmunomoduladoras de las WJ-MSCs, que serían capaces de remodelar el microambiente inflamatorio intraocular, generando un entorno más favorable para la reparación tisular. El cambio en el perfil de citoquinas en los fluidos oculares, como el humor acuoso y el humor vítreo, podría contrarrestar los efectos negativos de la inflamación sobre la degeneración del tejido nervioso asociada con el glaucoma. Los resultados de este estudio podrían respaldar el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento del glaucoma y contribuir significativamente a una mejor comprensión de los mecanismos involucrados en esta enfermedad.

3. OBJETIVOS

❖ **General**

Evaluar el perfil de determinadas citoquinas en el humor acuoso y humor vítreo en un modelo prospectivo, *in vivo*, experimental de HO y analizar su relación con la respuesta inmune intraocular en ojos tratados con inyección intravítrea de WJ-MSCs.

➢ ***Específicos***

1) Diseñar y estandarizar un modelo experimental con signos tempranos de HO en conejos Nueva Zelanda.

Para lograr este objetivo, se realizó los siguientes pasos: **A)** Revisión exhaustiva de la literatura científica para seleccionar el modelo animal más adecuado para la investigación. Esto incluyo la evaluación de estudios previos que hayan utilizado conejos Nueva Zelanda como modelo para inducir HO y la revisión de los métodos y protocolos utilizados en estos estudios; **B)** Selección del protocolo experimental basado en la revisión bibliográfica, se seleccionó un protocolo experimental para inducir HO en conejos Nueva Zelanda. Este protocolo implicó en la administración de glucocorticoides para aumentar la PIO; **C)** Prueba piloto: Realización de una prueba piloto para estandarizar el modelo. Esto implicó inducir HO en un grupo pequeño de conejos Nueva Zelanda siguiendo el protocolo seleccionado. Durante esta fase, se evaluó la efectividad y reproducibilidad del protocolo, así como la aparición de signos tempranos de HO, como el aumento de la PIO, alteraciones en nervio óptico y retina y **D)** Establecimiento del modelo experimental: Una vez que se confirmó la efectividad y reproducibilidad del protocolo en la prueba piloto, se procedió a establecer el modelo experimental con un número adecuado de conejos Nueva Zelanda. Esto implicó la inducción de HO en dos grupos de animales de acuerdo con el protocolo estandarizado.

2) Describir los cambios morfológicos y funcionales observados en la retina y el nervio óptico en el modelo experimental de HO antes y después de la intervención con MSCs.

En esta etapa de la investigación, se describió de manera general los cambios morfológicos y funcionales observados en la retina y el nervio óptico en el modelo experimental de HO. Esto proporciono información crucial sobre el efecto de las MSCs en la patología del glaucoma y su potencial terapéutico.

a) Para el análisis de las alteraciones morfológicas, se llevó a cabo las siguientes actividades:

Tomografía de Coherencia Óptica (OCT):

- Se realizaron mediciones del grosor de la capa de fibras del nervio óptico utilizando OCT antes de la intervención con MSCs.
- Se compararon estas mediciones con las obtenidas después de la intervención para evaluar cualquier cambio en el grosor de la capa de fibras del nervio óptico.

Estudio histológico:

- Se realizaron una evaluación histológica del nervio óptico y la retina mediante técnicas de tinción y microscopía.
- Se documentaron los cambios morfológicos observados en el nervio óptico y la retina en el modelo experimental de HO antes y después de la intervención con MSCs.

b) Para evaluar las alteraciones funcionales en la retina, se utilizaron técnicas especializadas que permitieron obtener información detallada sobre su función:

Respuesta pupilar fotocromática (RPF):

- Se analizo el diámetro pupilar en respuesta a diferentes intensidades de luz. Este análisis proporciono información sobre la función de las células fotorreceptoras y células ganglionares involucradas en la respuesta pupilar, lo que puede verse afectado por la HO y la intervención con MSCs.

Potencial visual evocado flash (flash-VEP):

- Se realizo el estudio electrofisiológico del potencial visual evocado flash en el modelo experimental de HO antes y después de la intervención con MSCs para identificar posibles cambios en la función visual.

3) Evaluar el efecto neuroprotector de la aplicación de MSCs en la retina y nervio óptico, así como su relación con las respuestas inmune e inflamatoria.

En esta etapa del estudio, se visó obtener una comprensión integral del efecto neuroprotector de las MSCs en la retina y el nervio óptico, así como su influencia en las respuestas inmune e inflamatoria en el contexto del modelo experimental de HO. Para el cumplimento de este objetivo empleamos una variedad de técnicas y análisis especializados:

Análisis histológico y morfológico:

- Se realizo cortes histológicos de tejido ocular para examinar la morfología de la retina y el nervio óptico.
- Se evaluó cambios en la arquitectura celular y la integridad de las capas retinianas. Además de observar signos de daño neuronal, inflamatorios y degenerativos.

Inmunohistoquímica:

- Se realizo tinciones inmunohistoquímicas para identificar y cuantificar la presencia de marcadores específicos de inflamación y respuesta inmune en la retina y el nervio óptico.
- Se evaluó la expresión de marcadores celulares, como células T y células gliales activadas

Análisis de citoquinas y mediadores inflamatorios:

- Se midieron los niveles de citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias en el humor acuoso y vítreo utilizando técnicas como ELISA.
- Se investigo la relación entre la aplicación de MSCs y la modulación de los perfiles de citoquinas, lo que puede indicar su efecto en la respuesta inflamatoria.

Análisis de respuesta inmune:

- Se evaluó la infiltración de células inmunes, como linfocitos T, en la retina y el nervio óptico mediante técnicas de inmunohistoquímica.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

En esta sección se describen las estrategias experimentales utilizadas en este estudio. Se detallan el tipo de estudio, consideraciones éticas, tamaño de muestra, características de los animales de experimentación, instalaciones y el diseño experimental. Las técnicas específicas se explican en mayor detalle en los anexos del apartado 5, Resultados.

4.1 Tipo de estudio

Este es un estudio *in vivo*, prospectivo y experimental, con una duración de 24 meses. Fue aprobado por el Comité de Investigación en Ética relacionado con el Bienestar Animal de la Escuela Superior de Oftalmología del Instituto Barraquer de América (CEIA-ESO-IBA), bajo la aprobación C-20190226-1, del 26 de febrero de 2019. El estudio se realizó en dos etapas experimentales: *un estudio piloto y una fase experimental* (Anexos 1, 2 y 3). La fase experimental se llevó a cabo en el Bioterio y la Sala de Cirugía Experimental de la Escuela Superior de Oftalmología del Instituto Barraquer de América, bajo la supervisión de veterinarios expertos en el manejo de animales de experimentación, siguiendo las directrices de la Asociación para la Investigación en Visión y Oftalmología (*ARVO, Association for Research in Vision and Ophthalmology*) y la normativa vigente de Colombia de acuerdo a la Ley 84 de 1989, capítulo VI titulado: "Del uso de animales vivos en experimentos e investigación" (República de Colombia, Ley 84 de 1989) y la Resolución 8430 de 1993, en el Título V, menciona la investigación biomédica en animales.

4.2 Consideraciones éticas

Esta investigación se desarrolló conforme a los requisitos para la realización de actividades investigativas en salud, según la Resolución 8430 del Ministerio de Salud de 1993, prevaleciendo el respeto, la dignidad y la protección de los derechos y el bienestar de los animales incluidos en el estudio. Se trató de un estudio con riesgo mínimo para el modelo experimental propuesto. La valoración del bienestar animal se realizó mediante el control de síntomas y signos de dolor, además de procedimientos estándar como exámenes físicos, exploración oftalmológica de los anexos oculares y del segmento anterior y posterior, medición de la PIO, flash-PEV, Tomografía de Coherencia Óptica y evaluación de la RPF. Para la inducción del modelo experimental de glaucoma crónico se respetó la Declaración de Helsinki de 1989, priorizando la seguridad de los animales. Los exámenes oftalmológicos fueron realizados por el investigador principal y especialistas en

oftalmología en las instalaciones de la Escuela Superior de Oftalmología del Instituto Barraquer de América. Para la obtención de las MSCs humanas, el laboratorio a cargo del procesamiento de las muestras, Advanced Therapies Unit, Instituto Distrital de Ciencia Biotecnología e Innovación en Salud (IDCBIS) en Bogotá, Colombia, contaba con el consentimiento informado de los donantes, quienes autorizaron su participación en la investigación con pleno conocimiento de la naturaleza de los procedimientos, capacidad de libre elección y sin coacción alguna.

4.3 Tamaño de la muestra

Este proyecto se aplicó siguiendo el principio de "Reducción" propuesto por Russell y Burch, según lo exigido por el Ministerio de Salud en la Resolución 8430 de 1993. Se utilizó el número mínimo de animales de experimentación para obtener resultados científicamente válidos. En la presente investigación se emplearon 4 animales para el estudio piloto y 15 animales para la fase experimental. En la prueba piloto, se aplicó un método estadístico por conveniencia en la muestra estudiada, con el fin de obtener datos básicos y tendencias respecto al estudio. Esta técnica de muestreo fue útil para documentar el aumento de la PIO y las posibles alteraciones derivadas de la inducción de HO en la muestra estudiada. El número de animales para la fase experimental del estudio se calculó con base en la fórmula descrita a continuación y utilizando un programa para cálculo de la muestra (293). Sin embargo, no secuenta con estudios previos que nos permitan estimar el tamaño muestral exacto. No obstante, debido a la falta de estudios previos que permitieran estimar con precisión el tamaño muestral, se decidió seleccionar un tamaño muestral mínimo (n=15) basados en estudios similares (294,295), utilizando un nivel de confianza del 95% con un margen de error del 5%.

4 .4 Animales de experimentación e Instalaciones

Se emplearon conejos adultos, con edad superior a 8 semanas, de 2-3 kg de peso, machos, de la raza Nueva Zelanda, variedad blanca y ojos rosados, procedentes de un criadero de conejos (Sentagro E.A.T. / NIT: 900131278-7) (ver figura 19). Cada conejo fue numerado con tinta insoluble y no tóxica en la oreja derecha.

Figura 19: Muestra experimental. Conejo Nueva Zelanda

Durante el estudio, los animales se mantuvieron en un ambiente controlado con 50 ± 20% de humedad relativa, temperatura ambiente de 15-23 ºC e iluminación de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad. Se les suministró dieta estándar de mantenimiento para conejos una vez al día, además de agua y heno *ad libitum.* Los animales fueron alojados individualmente en jaulas de 60 cm de frente x 40 cm de alto x 50 cm de ancho. Cabe resaltar que durante todo el período experimental los animales no sufrieron ningún tipo de privación.

- ***PROTOCOLO UTILIZADO EN EL MANEJO DE LOS ANIMALES***

- Recepción de los animales: Los animales fueron recibidos por la coinvestigadora acompañada de un médico veterinario de la ESO-IBA, quienes manipularon e inspeccionaron los animales sin recurrir a métodos que pudieran causarles temor, lesiones o sufrimientos innecesarios. Solo se trasladaron animales en condiciones óptimas para viajar, asegurando que la duración del viaje fuera la mínima necesaria. Al llegar a la institución, se realizó un examen detallado (inspección de mucosas, dentición, examen ocular, inspección de piel y anexos e inspección de nódulos linfoides), y se procedió a su marcaje. Posteriormente, los animales fueron sometidos a un período de observación y aclimatación en jaulas etiquetadas y separadas del área de acondicionamiento (área experimental) durante 15 días. Se respetó un cronograma diario de manejo de los animales. Todos los procedimientos invasivos se realizaron en la mañana (8-11 h), con el fin de disminuir los riesgos relacionados con la anestesia. Como parte de la supervisión y seguimiento de la salud animal, se realizó una supervisión diaria, incluidos fines de semana y días festivos, con búsqueda intencionada de signos de dolor y otros indicadores de bienestar.

- Mantenimiento de los animales: Los datos obtenidos durante la inspección de los animales fueron registrados en una hoja de valoración. Para asegurar un cuidado continuo del animal y mantener actualizadas las hojas de valoración, se integró al equipo un responsable técnico/cuidador de animales que trabajó junto con la coinvestigadora y el personal técnico. Cualquier muerte súbita o desviación de la normalidad en los animales se reportó de inmediato, asegurando así un cuidado médico-veterinario adecuado y oportuno. La valoración del bienestar animal se realizó con énfasis en el control de los síntomas, cambios comportamentales y signos de dolor. La evaluación clínica se realizó con el animal despierto, observándolo durante un período breve para evitar cambios en la expresión facial no relacionados con su estado de salud. Las manifestaciones clínicas de dolor en conejos son características, pero pueden pasar inadvertidas si la intensidad es leve. Se revisaron los criterios indicativos de analgesia, resumidos en la Tabla 2 (296). A cada característica mencionada en la escala de dolor se le asignó un puntaje de 0 a 2 (ver tabla 3). Si se identificaba una o más características en la escala de 0 a 1, se aplicaba el esquema 1 de manejo del dolor; si se identificaba una o más características en la escala de 1 a 2, se aplicaba el esquema 2 (ver tabla 4).

Tabla 2: Signos indicativos de dolor en conejo.

SIGNOS Y SÍNTOMAS INDICATIVOS DE DOLOR EN EL CONEJO	
Signos generales:	• Actividad reducida, permanece inmóvil o se desplaza lentamente o con esfuerzo, cojera • Deshidratación: pelo sin brillo, piel sin elasticidad, ojos hundidos • Depresión, letargia, apatía • Acicalamiento anormal y empeoramiento del pelaje • Cambios en la ingestión de agua y alimento: es reducida, se prolonga en el tiempo o incluso, la comida se cae de la boca • Estrabismo, secreciones oculares, ojos cerrados, palidez (albinos) • Posturas anormales: contracciones del abdomen con tensión de la pared muscular, arqueamiento al estar sentado, presión con la cabeza en la pared de la jaula • Autoprotección de la zona dolorosa, frotarse con la esquina de la jaula, tendencia a esconderse (cuando no lo suele hacer) o agresividad súbita inesperada • Perdida del interés por lo que le rodea • Rechinar de dientes • Vocalización o rechinar de dientes cuando se mueve, defeca, orina o durante la manipulación • Patrón respiratorio modificado (incluso cambios sutiles) • Incapacidad para descansar o dormir o trastornos del sueno • Expresión facial de ansiedad: pupilas dilatadas, ausencia reflejo palpebral Salivación incrementada • Aislamiento del grupo
Dolor leve a moderado:	Descarga ocular, protrusión de la membrana nictitante o fotofobia, constipación o diarrea, depresión, apoyo de la espalda en el fondo de la jaula, acicalamiento excesivo, ingesta reducida de agua y alimento, desinterés, agresividad o vocalización durante la manipulación, rechinar de dientes
Dolor intenso o crónico:	Rechinar de dientes, letargia, deshidratación, perdida de peso, presencia de heces en la zona anal, perdida de masa muscular en cuartos traseros, producción reducida de heces nocturnas, falta de respuesta a estímulos
Signos clínicos que aconsejan analgesia	1. Apariencia anormal: ansiedad, depresión, inactivo, inquieto 2. Chillidos o quejidos 3. Rechinar de dientes 4. Inmovilidad tónica 5. Rechaza el agua y/o el alimento 6. Perdida de peso

Tabla 3: **Escala del dolor**.

Dolor	Escala
Ausente	0
Moderado	1
Severo	2

Tabla 4: Manejo del dolor.

	Agente	Dosis	Vía de administración	Frecuencia
Esquema 1	Meloxicam	0,3 y 0,6 mg/kg	SC	Cada 24 hrs durante 3 días
Esquema 2	Meloxicam	0,3 y 0,6 mg/kg	SC	Cada 24 hrs durante 3 días
	Buprenorfina	0.03 mg/mL	SC	Cada 12 hrs durante 3 días

- Aislamiento del animal enfermo y punto humanitario: La valoración del bienestar animal se realizó con especial énfasis en el control de síntomas, cambios comportamentales y signos de dolor para determinar el momento del punto final pre-letal. Se siguieron algunos criterios humanitarios de punto final, tales como: cuando el animal ya no proporciona información científica útil debido a un grave deterioro fisiológico o perturbación psicológica; cuando el sufrimiento causado a los animales durante el estudio excede lo previsto, haciendo que la proporcionalidad entre el costo/beneficio se pierda, es decir, cuando el daño al animal supera el beneficio buscado; cuando el nivel de sufrimiento es tan alto que resulta inaceptable causar tal grado de daño; y cuando un alto grado de sufrimiento podría estar justificado, pero no es necesario causarlo porque se puede predecir el punto final científico de manera anticipada, en un nivel pre-letal o de pre-dolor.

- Técnicas utilizadas para la inyección: Todos los procedimientos invasivos en los animales se realizaron bajo técnicas asépticas, con el uso de anestesia y analgesia, conforme a los procedimientos estandarizados de la Unidad de Cirugía Experimental Barraquer. La sujeción del animal para la aplicación de las gotas oftálmicas e inducción de la anestesia se realizó de forma firme, con confianza y delicadeza, sujetando con la mano derecha la piel del dorso, a nivel de la región lumbar, y con la izquierda inmovilizando las patas traseras, que en ningún caso deben quedar libres para evitar que el animal pueda herir al manipulador. En caso de agresividad, se utilizó una bolsa de contención para minimizar el estrés y el daño físico del animal (ver figura 20). En esta investigación, se emplearon inyecciones con agujas calibre 25G-30G por vía intramuscular, para lo cual se sujetó al conejo localizando los músculos gruesos de las piernas. Durante todo el periodo de estudio, se contó con el acompañamiento de un médico veterinario de la Escuela.

- Normas de seguridad y protección utilizadas: Para asegurar buenas condiciones de mantenimiento y salud de los conejos, el personal de mantenimiento respetó las normas del manual de la CEIA-ESO-IBA, tales como: higiene personal, uso de vestimenta adecuada, procedimientos de limpieza de ambientes y eliminación de desechos. Durante la manipulación de los conejos, se trabajó con el menor ruido posible para reducir el estrés de los animales; se utilizaron guantes quirúrgicos para su manejo; se permitió el acceso únicamente a personas autorizadas; y cualquier accidente se informó de inmediato al coinvestigador.

Figura 20: Técnica de contención y sujeción utilizadas en los animales en la presente investigación. Fuente: *Archivo personal.*

- **Destino final de los animales**

Posterior a la eutanasia en la sala de cirugía experimental de la CEIA-ESO-IBA, los cadáveres de los animales se recolectaron en bolsas rojas marcadas con la leyenda “Residuos de animales, CONEJO, fecha” y se almacenaron a 4 °C para su posterior transporte, según lo señalado en la "Ruta sanitaria de residuos biológicos" de la Clínica Barraquer.

- ***Criterios de Exclusión***

- Presentar enfermedades de la superficie ocular tales como: queratitis o conjuntivitis crónicas de cualquier etiología, incluyendo el síndrome de ojo seco.
- Presencia de opacidad del cristalino.
- Presencia de enfermedades inflamatorias sistémicas.
- Presencia de lesión retiniana que pueda influir posteriormente en los datos del estudio.
- Pérdidas de peso severas (≥10% del peso inicial).

4.5 DISEÑO EXPERIMENTAL

- Para el cumplimento del objetivo específico 1: *"***Diseñar y estandarizar un modelo experimental con signos tempranos de HO en conejos Nueva Zelanda***"* se realizó:

A) Revisión literatura: Modelos experimentales de HO y Cinética Inflamatoria: Con el fin de establecer el modelo de investigación a utilizar en este estudio y obtener marcadores específicos para la inflamación y respuesta inmune que se utilizarán en la fase experimental, se realizaron búsquedas en la literatura en diferentes bases de datos. Para esta fase investigativa, se estableció una única pregunta con el objetivo de direccionar el enfoque propuesto: ¿Cuál es el mejor modelo experimental de HO? (ANEXO 0) ¿Cuáles marcadores inflamatorios están involucrados en el glaucoma?

Para esta investigación se utilizó: A) Revisión de abstracts y, cuando fue necesario, de artículos completos; B) Las bases de datos: PubMed, ScienceDirect, Google Scholar, SciELO y Cochrane; y C) Principales palabras clave: investigación con animales, ética, glaucoma, anatomía animal, glaucoma experimental, células madre, glaucoma genético, neuroprotección, citoquinas y humor acuoso. Basado en la revisión bibliográfica, se seleccionó un protocolo experimental para inducir HO en conejos Nueva Zelanda, que implicó la administración de glucocorticoides para aumentar la PIO. Esta investigación consta de dos etapas de ejecución: estudio piloto y fase experimental. Primeramente, se describirá el protocolo utilizado en el estudio piloto. A partir de los resultados obtenidos en esta fase, se inició la fase experimental.

- **ESTUDIO PILOTO**

Transcurrido el período de 15 días de aclimatación de los animales, se realizó la estandarización del modelo de HO para ajustar la dosis del medicamento y las medidas de la PIO. Para este estudio, se utilizaron 4 animales, divididos en 2 grupos experimentales asignados aleatoriamente. Este estudio se llevó a cabo durante un período de 4 semanas (ver figura 21). El ojo derecho (OD) de cada animal se asignó como experimental y el ojo izquierdo (OI) se utilizó como control. Cada conejo tuvo su propio control. Cabe destacar que todas las evaluaciones fueron realizadas por un mismo evaluador, con la asistencia de un auxiliar para el posicionamiento de los animales.

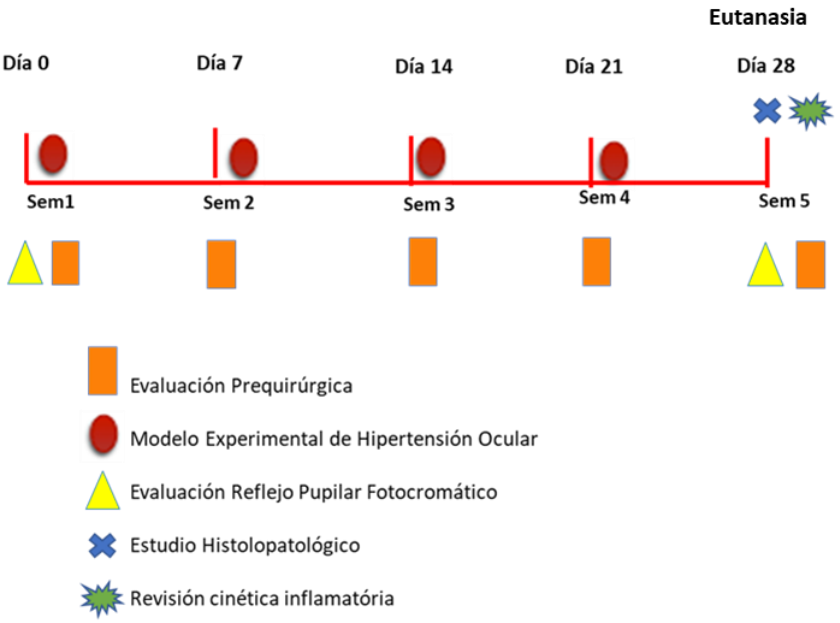


Figura 21: Diseño experimental del estudio piloto. Esquema de los procedimientos realizados en el estudio

- ***Evaluación Prequirúrgica***

Antes de someter a los animales al procedimiento, se realizó una evaluación prequirúrgica diaria, que incluyó: pesaje, exploración oftalmológica de los anexos oculares, segmento anterior y posterior, y medidas de la PIO. Estas variables se registraron en la historia clínica de cada animal. Además, se obtuvieron registros fotográficos del segmento anterior del ojo una vez por semana durante un período de 4 semanas, utilizando una cámara fotográfica digital Nikon (D610, Tokio, Japón), con el fin de documentar posibles alteraciones observadas en el modelo experimental.

- *Pesaje:* Se llevó a cabo semanalmente en una báscula de laboratorio digital para garantizar que no hubiera pérdidas de peso relacionadas con un deterioro del estado general del animal.
- *Exploración oftalmológica de los anexos oculares, segmento anterior y posterior*: La exploración oftalmológica completa se realizó a la misma hora del día (9:00 - 11:00 h), con el animal despierto, de forma ordenada, sistemática y con contención cautelosa. Con la ayuda de la lámpara de hendidura (*Kowa SL-15 Portable Slit-Lamp Biomicroscope, Tokyo, Japón*) se evaluó el aspecto de los órganos anexos, la córnea, la cámara anterior y el cristalino; posteriormente, se evaluó la presencia de turbidez y celularidad en la cámara anterior y el vítreo caracterizando

un proceso inflamatorio. También se utilizó la oftalmoscopia indirecta (*Oftalmoscopio Indirecto Keeler Vantage Plus LED, Reino Unido, Inglaterra*) con el uso de una lente de condensación 20 dioptrias (*Lente Volk 20D, Volk, Estados Unidos*) para evaluación del segmento posterior.

- ***Inducción de la HO***

Para inducir un incremento de la PIO, se utilizó una combinación de acetato de prednisolona tópico (*Prednefrin Forte® Colirio 10 mg/mL – Allergan, Brasil)* dos veces al día, todos los días. Previamente, se aplicó colirio anestésico y 0,5 ml de acetato de betametasona (*Celestone Cronodose®, fosfato disódico 3+3 mg/mL, Schering-Plough, México*) por vía subconjuntival, una vez a la semana en el ojo derecho del modelo experimental durante un período de 4 semanas (ver figura 22). En el ojo control se instiló solución fisiológica. Cabe recalcar que los animales no fueron sometidos a anestesia general para la inducción de la HO.

Transcurrido el período de 4 semanas y tras la inducción de la HO, los conejos fueron anestesiados con una mezcla de clorhidrato de ketamina (*Imalgene 1000, Merial; 35 mg/Kg*) y clorhidrato de xilazina (*Rompum, Bayer; 5 mg/Kg*), administrado por vía intramuscular. Posteriormente, se realizó la eutanasia con una sobredosis de pentobarbital sódico al 3% por vía intravenosa (*Sigma-Aldrich®, 100 mg/Kg, Estados Unidos*), respetando las normas descritas en la Resolución 8430 de 1993 de Colombia y la Declaración de Helsinki de 1989.

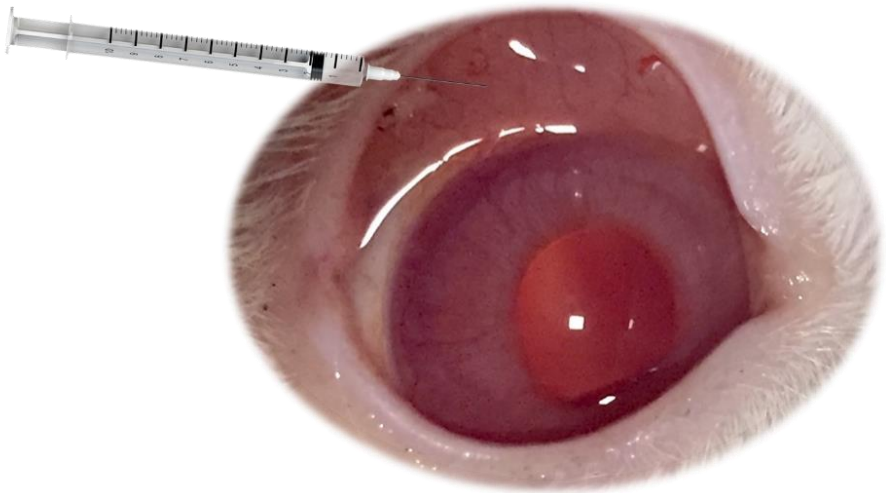


Figura 22: Inducción de HO. Aplicación subconjuntival de glucocorticoides en conejos raza Nueva Zelanda. **Fuente**: *Archivo personal.*

- ***Variables medidas para evaluar la efectividad y reproducibilidad del protocolo de HO***

1. ***Evaluación de la respuesta pupilar fotocromática***: Todos los animales fueron sometidos a la evaluación de la RPF utilizando el aparato BPI -50 (*Retinographics, USA*) antes de la inducción de HO. Para realizar este estudio, los animales fueron acomodados dentro de una jaula de 60 cm x 60 cm, manteniéndolos en un estado de adaptación a la oscuridad. La fuente de luz fue dirigida en posición dorsal hacia la parte ventral y viceversa sobre los ojos de los animales, abarcando toda la retina. Se utilizaron estímulos de luz azul (460 nm) y roja (640 nm) de baja intensidad, con un intervalo de 10 minutos entre las pruebas, realizadas en las semanas 1 y 4. Las variables observadas en la respuesta pupilar fotocromática fueron: contracción pupilar (ojo con respuesta) clasificada como capacidad visual, y sin contracción pupilar (ojo sin respuesta) clasificada como alteración en la respuesta visual.

2. ***Medidas de la PIO***: Los valores de PIO se tomaron en ambos ojos con un tonómetro de aplanación (*Tono-pen Avia Applanation Tonometer*, Reichert Technologies, *Estados Unidos*) (ver figura 23). Para las mediciones de PIO se utilizó colirio anestésico a base de proparacaína 0,5% (*Alcaíne®, Laboratorios Alcon, El Masnou, Barcelona*) antes de las mediciones. Para minimizar el posible error en la toma de medidas de PIO, las tomas fueron realizadas por una misma persona y se realizó una sujeción delicada en los animales evitando ejercer presión en la zona del cuello o la cabeza. Para cada medición de PIO se cambió el protector del tonómetro (*Protect Ocu-film Tono-Pen®, Reichert Technologies, Estados Unidos*), evitando contaminación entre animales. Se tomó 5 lecturas en cada ojo. Las medidas fueron realizadas en todos los grupos antes de la inyección subconjuntival, dos veces al día.

Figura 23: Medidas de la PIO. Posición correcta para la toma de medidas de la PIO con tonómetro de aplanación *Tono-pen Avia.* **Fuente**: *Archivo personal.*

Procesamiento de la muestra

Una vez finalizado el período experimental de inducción de HO, todos los ojos fueron enucleados y procesados para su estudio histológico.

- **Enucleación**: Una vez concluido el proceso de eutanasia los globos oculares se enuclearon (297). Para esta técnica, los párpados fueron suturados con nylon 4.0, utilizando como puntos de referencia adicionales la inserción del músculo recto en la parte dorsal de cada ojo, así como la carúncula nasal. La remoción de los ojos se realizó mediante una incisión en la zona nasal y temporal de la piel con una hoja de bisturí nº 15. Se seccionó el tejido y los músculos circundantes con tijeras de enucleación hasta alcanzar la órbita ósea. Posteriormente, se traccionó el bulbo ocular hacia adelante y se cortó el nervio óptico para su análisis posterior.

3. ***Estudio histopatológico*:** Con el propósito de identificar la muerte de las células ganglionares de la retina (CGRs) o cualquier alteración en el nervio óptico que representara signos característicos de glaucoma, se llevó a cabo un estudio histopatológico del tejido. Cabe destacar que las muestras del estudio piloto fueron procesadas en un laboratorio externo, “Coplow (Comparative

Ocular Pathology Laboratory of Wisconsin)". Las muestras macroscópicas fueron marcadas con suturas para facilitar la orientación en las áreas lateral (sutura azul) y medial (sutura negra), y teñidas en colores negro para la zona superior y verde para la inferior, manteniendo su ubicación durante la evaluación histopatológica (ver figura 24). Posteriormente, fueron fijadas en solución de formaldehído tamponado al 10% (pH 7,4) durante 48 horas. Los ojos se cortaron en dirección dorsoventral, tomando como parámetro de corte el nervio óptico. Los cortes de 5 mm fueron colocados en cajas de inclusión para su procesamiento posterior.

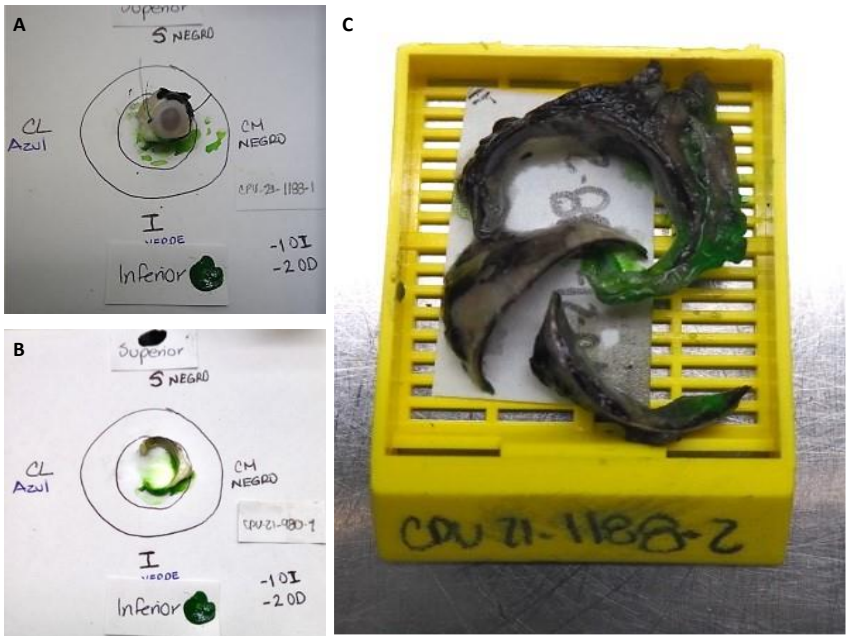


Figura 24: **Estudio histopatológico**. **A)** Identificación con suturas en el borde lateral (sutura azul) y medial (sutura negra) en el ojo, y con tinciones de los bordes superior (negro) e inferior (verde); **B)** Corte transversal del ojo sin córnea, manteniendo el tejido que corresponde a la región superior e inferior de la retina y en el centro del corte el nervio óptico y **C)** Ubicación del corte principal y los laterales en cajas de inclusión para posterior procesamiento. **Fuente**: *Archivo personal.*

Las muestras incluidas en parafina fueron lavadas en agua corriente y procesadas en un procesador automático de tejidos siguiendo los ciclos: 20 minutos en alcohol al 60%, 20 minutos en alcohol al 70%, 2 pasos de 20 minutos en alcohol al 95%, 2 pasos de 20 minutos en alcohol al 100%, 2 pasos de 20 minutos en alcohol al 100% con xileno, 2 pasos de 20 minutos en xileno y, por último, 4 pasos de 15 minutos cada uno a 60°C con presión y vacío en parafina. A continuación, las muestras fueron incluidas en parafina y cortadas transversalmente en secciones consecutivas de 4-6 µm de espesor en el microtomo, hasta alcanzar el centro del nervio óptico, incluyendo la retina. Previamente a la tinción con hematoxilina eosina (PAS), los

cortes histológicos fueron desparafinados para permitir la penetración en el interior de los tejidos de las soluciones acuosas utilizadas durante la tinción. Para ello, las muestras se mantuvieron en una estufa a 60°C durante toda la noche y, posteriormente, se incubaron con xileno puro en tres pasos de 5 minutos cada uno. Para rehidratar las muestras, éstas se pasaron por alcoholes de concentración decreciente (100%, 90%, 70% y 50%) manteniéndolas durante 3 minutos en cada uno de ellos. Posteriormente, los cortes fueron lavados con agua y se tiñeron con hematoxilina por 5 minutos. Se lavaron por 1 minuto y se diferenciaron con alcohol ácido por 1 minuto. Luego, se sumergieron en agua amoniacal hasta adquirir la coloración azul (sumergidas 2 o 3 veces). De nuevo se lavaron por 1 minuto y se pasaron por etanol al 95% por 1 minuto más. La tinción con eosina se hizo por 45 segundos y de nuevo se pasó a deshidratación por alcoholes en concentración ascendente (50%, 70%, 90% y 100%). Se ubicaron en gradilla al interior de xilol por 2 minutos y posteriormente se les aplicó la resina Entellan® (*Euromex PB5265*), se ubicó la laminilla sobre el corte y dejarlo listo para la evaluación histológica. Mediante la tinción con PAS, se estudiaron los cambios morfológicos producidos en los tejidos como consecuencia de la HO.

- ***Análisis estadístico del estudio piloto***

El análisis estadístico de los datos se realizó utilizando el programa *SPSS Statistics 21.0*. Se utilizaron dos grupos para el análisis: ojo experimental y ojo control. Las variables tratadas fueron cuantitativas (medición de PIO) y se utilizó una prueba no paramétrica para el análisis estadístico. El valor de significación establecido para todos los análisis fue $P \leq 0,05$.

➢ FASE EXPERIMENTAL DEL ESTUDIO

A partir de resultados encontrados en el estudio piloto se desarrolló la fase experimental.

- **Grupos experimentales**

La muestra total del estudio consistió en 30 ojos de conejos Nueva Zelanda (15 animales) con características similares y provenientes del mismo criadero descrito en el estudio piloto. En cada grupo se analizaron tanto los ojos derechos (ojos experimentales, n=5) como los ojos contralaterales (control, n=5). Cada animal sirvió como su propio control. La muestra se dividió en 3 grupos experimentales:

- ✓ **Grupo 1: HO** (n=5 animales, 10 ojos)
- ✓ **Grupo 2**: **aplicación de WJ-MSCs intravítrea**, (n=5 animales, 10 ojos)

✓ **Grupo 3: HO + aplicación de WJ-MSCs intravítrea** (n=5 animales, 10 ojos).

- **Diseño del estudio**

Este estudio se realizó durante un período de 9 semanas (ver figura 25). En esta fase experimental, se utilizó el mismo protocolo descrito en el manejo de los animales, *la evaluación prequirúrgica, las variables medidas para cumplir con los objetivos del estudio, la inducción de la HO y el procesamiento de la muestra, como en el estudio piloto*. En los apartados siguientes se describen técnicas adicionales empleadas en esta fase para cumplir con los objetivos propuestos.

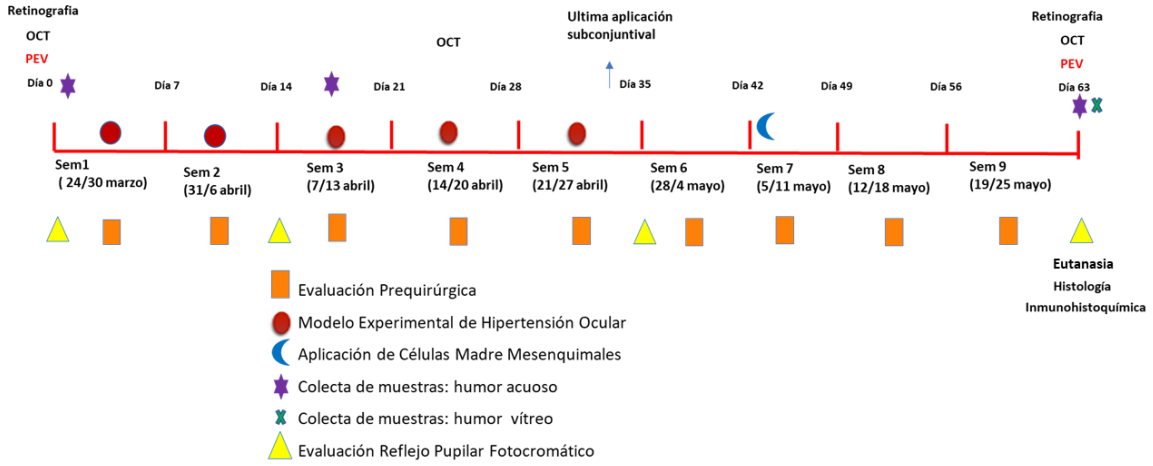


Figura 25: Diseño Experimental. Esquema realizado el estudio en la fase experimental.

➢ ***PROTOCOLOS ESTABLECIDOS EN LA FASE EXPERIMENTAL***

- **Inducción del Modelo Experimental de HO:** El modelo de inducción de HO se llevó a cabo en un período de 5 semanas en los grupos 1 y 3. Las dosis utilizadas fueron previamente estandarizadas en el estudio piloto.
- **Anestesia:** Para la obtención de la muestra de humor acuoso, la aplicación MSCs y el procedimiento flash-PEV, los conejos fueron anestesiados con una mezcla de clorhidrato de ketamina (*Imalgene 1000, Merial; 35 mg/Kg)* y clorhidrato de xilazina (*Rompum, Bayer; 5 mg/Kg*), administrada por vía intramuscular con limpieza previa del sitio de aplicación con alcohol polivinílico. Una vez finalizado el procedimiento, los animales fueron acondicionados en jaulas durante el período postquirúrgico, con un adecuado control de temperatura y manejo del dolor.

➢ Procedimientos al finalizar la fase de inducción de HO

❖ *Aplicación de* MSCs*: Cultivo y Técnica*

Los procedimientos relacionados con la manipulación de células vivas se llevaron a cabo en la Unidad de Terapia Celular del Instituto Distrital de Ciencia Biotecnología e Innovación en Salud (IDCBIS) en Bogotá, Colombia, bajo condiciones de esterilidad, utilizando una campana de flujo laminar irradiada con luz ultravioleta y limpiando las superficies con una solución de etanol al 70%. Toda la manipulación y procesamiento celular fueron realizados por el equipo del Dr. Gustavo Salguero y amablemente cedidos para esta investigación.

- **Cultivo celular y obtención de los medios condicionados de WJ-MSCs**

Las WJ-MSCs utilizadas en este estudio fueron obtenidas de cordones umbilicales humanos, donados por mujeres embarazadas con consentimiento previo para su uso en investigación, aprobado por el Comité de Ética de la Secretaría Distrital de Salud de Bogotá. Los criterios de exclusión para las donantes de cordón umbilical incluyeron variables sociodemográficas, antecedentes de anomalías congénitas, deficiencias inmunitarias o metabólicas, y enfermedades infecciosas durante el embarazo.

Las muestras se procesaron según los criterios previamente establecidos por el grupo de investigación de la Unidad de Terapia Celular (ver figura 26). Una vez que el tejido del cordón umbilical llegó al Instituto, se analizó la sangre del cordón umbilical para detectar VIH, VHC, HVB, enfermedad de Chagas y sífilis. Además, los tejidos del cordón fueron sometidos a examen para verificar la presencia de meconio, diámetros de cordón umbilical inferiores a 1 cm, exceso de sangre en venas y arteria umbilical, o cordón inferior a 15 cm. Los cordones umbilicales obtenidos de partos vaginales y por cesárea de recién nacidos a término se seccionaron (10 cm de longitud) y se transfirieron inmediatamente a la instalación de procesamiento en contenedores estériles cargados con solución salina tamponada con fosfato (PBS) (*Gibco™, Life Technologies, Carlsbad, CA, EE. UU*.) suplementado con penicilina al 1%/estreptomicina (P/S) 10000 U/10000 mg/mL (*Gibco™, Life Technologies, Carlsbad, CA, EE. UU*.).

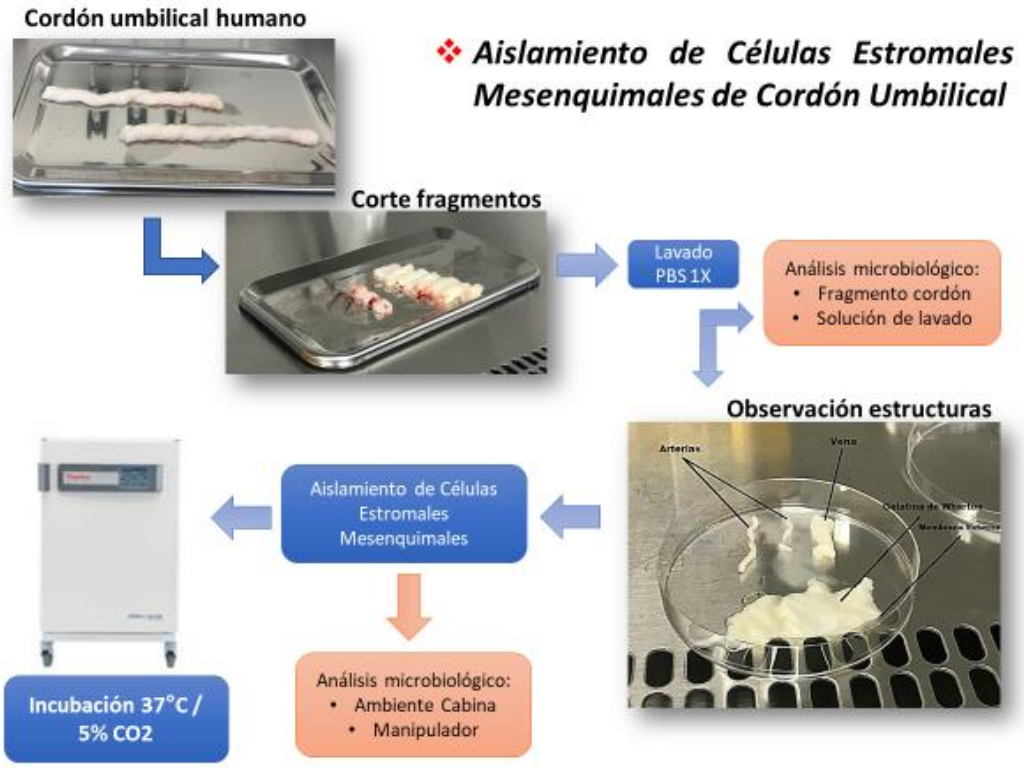


Figura 26: **Metodología seguida para el aislamiento de WJ-MSCs a partir de cordón umbilical humano**. **Fuente**: *Dra. Mariana Cañas Arboleda.*

Para minimizar la contaminación de células hematopoyéticas, se realizaron varios pasos de lavado con PBS estéril. La gelatina de Wharton se separó del tejido, se transfirió a placas de cultivo en DMEM suplementado con lisado de plaquetas humanas (hPL) al 10% más 1% de antibióticos, y se incubó a 37°C y 5% de CO2. Los medios de cultivo se reemplazaron cada tercer día hasta que las células alcanzaron una confluencia del 70% al 80% (ver figura 27).

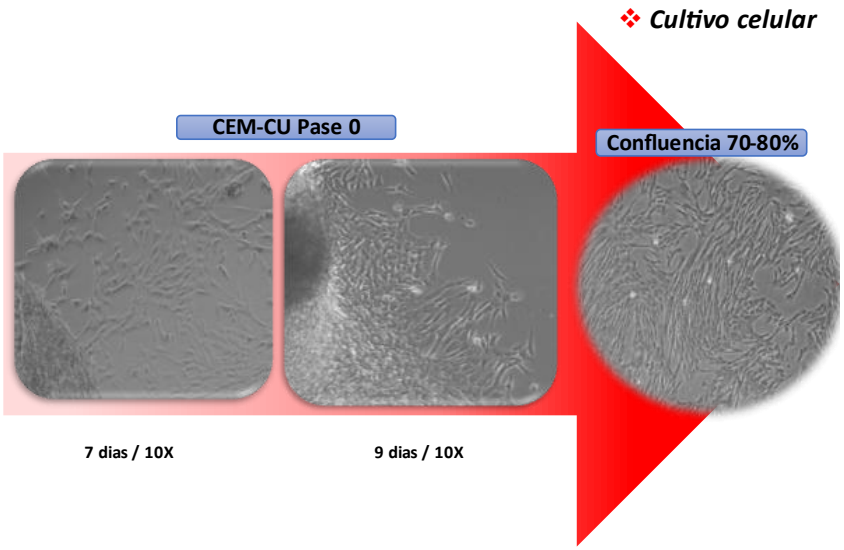


Figura 27: **Metodología seguida para el análisis de cultivo celular de WJ-MSCs a partir de cordón umbilical humano.** Las suspensiones celulares obtenidas fueron sembradas y cultivadas. **Fuente:** *Dra. Mariana Cañas Arboleda.*

- **Análisis microbiológico**

Para evaluar la presencia de contaminación microbiana en las fases de recolección y procesamiento del cordón umbilical, se realizaron análisis microbiológicos en la solución de PBS utilizada para el transporte de los fragmentos a las instalaciones de procesamiento, en la solución de lavado (PBS 1x, 1% P/S), en los fragmentos de cordón umbilical y en el medio de cultivo en el pasaje 0 (P0). El examen de muestras y fluidos para detectar la presencia de microorganismos se realizó utilizando frascos de hemocultivo y caldo de tioglicolato. El caldo de tioglicolato se incubó durante 72 horas a 35°C y 5% de CO2; los frascos de hemocultivo se incubaron en una atmósfera estándar de 35°C durante siete días para gérmenes aeróbicos y anaeróbicos, utilizando el sistema de detección microbiana BACT/ALERT® 3D (bioMérieux). Las muestras positivas se tiñeron con Gram y se subcultivaron en agar sangre y MacConkey, incubándose durante 72 horas a 35/36°C y 5% de CO2; los microorganismos aislados se identificaron mediante el sistema VITEK® 2 (bioMérieux).

- **Análisis viabilidad, recuperación y expansión celular**

Las WJ-MSCs se recogieron y resuspendieron en una concentración final de 1x10^6 células/mL. Las células se transfirieron a 1000 µL de medio preenfriado, que contenía DMEM y sulfóxido de dimetilo al 10% (DMSO) complementado con lisado plaquetario humano al 30% o FBS

al 30%. Las células fueron crioconservadas utilizando un congelador de velocidad controlada CryoMed a una velocidad de congelación de 1°C por minuto o colocando crioviales en gradillas de isopropanol preenfriadas (Mr. Frosty, Nalgene®) y transfiriéndolas al congelador a -80°C durante 24 horas antes de su almacenamiento final en vapor de nitrógeno líquido. Las muestras de células se almacenaron durante un mes hasta su descongelación (ver figura 28).

Figura 28: Crioconservación de las células WJ-MSCs, seguido de análisis celular. **Fuente**: *Dra. Mariana Cañas Arboleda.*

Durante el proceso de apoptosis o muerte celular programada, se producen cambios morfológicos en las células, incluyendo alteraciones en los niveles de ATP. Por lo tanto, la marcación celular mediante la generación de una señal luminiscente proporcional a la cantidad de ATP permite determinar el número de células viables en cultivo, siendo un indicador de células metabólicamente activas.

Para evaluar la viabilidad y la recuperación, las WJ-MSCs se descongelaron y lavaron. La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo (Promega, Wisconsin, EE.UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se eliminaron los sobrenadantes de cultivo y se agregaron 200 µL de DMEM y 200 µL de CellTiter-Glo por pocillo. A continuación, la placa de pocillos se incubó durante 2 minutos con agitación constante para permitir la interacción entre el ATP producido por las células y el sustrato luciferina catalizado por

Ultra-GLO rLuciferase, generando una señal luminiscente. La luminiscencia se midió posteriormente en un lector de placas (Synergy/HTX, BioTek, Winooski, Vermont, EE.UU.). El número de células viables presentes en cada pocillo fue proporcional a la señal luminiscente registrada. Además, la duplicación de la población (DP) durante el cultivo de 5 días se determinó mediante la fórmula: PD= (N/N0) /2, donde N0 es la señal luminiscente obtenida después de 24 horas de cultivo y N es la señal luminiscente obtenida después de 5 días de cultivo. De igual manera, el tiempo de duplicación de la población (PDT) se calculó usando la fórmula: PDT= D/PD, donde D son los días de cultivo y PD la duplicación de la población. Los cultivos se monitorearon en distintas fases del estudio para visualizar la expansión celular (ver figura 29). En este estudio, se utilizaron células madre en la fase 3 de expansión celular.

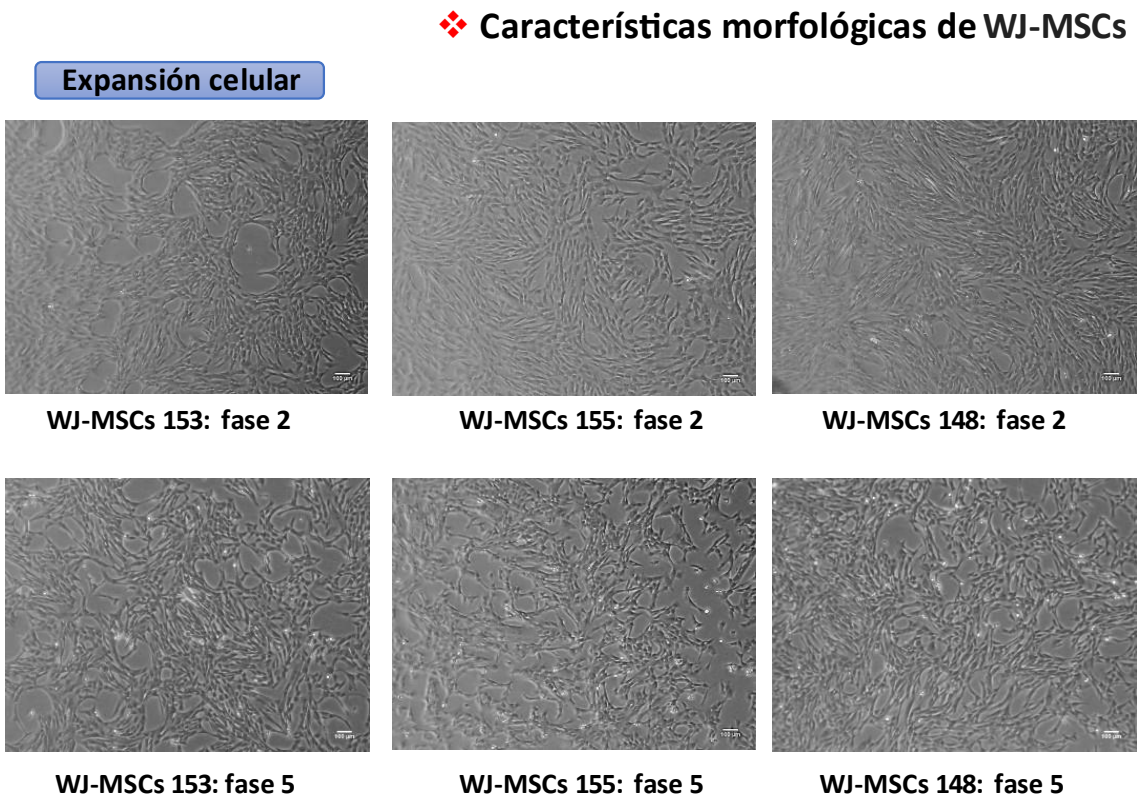


Figura 29: Análisis de expansión celular. Diferencias morfológicas observadas en distintas fases del cultivo celular en distintos pacientes. **Fuente**: *Dra. Mariana Cañas Arboleda.*

- **Análisis Inmunofenotípico de las WJ-MSCs**

Para caracterizar la población celular obtenida del cordón umbilical humano, se analizó la expresión o ausencia de expresión del panel de marcadores establecido por la ISCT como definitorio

de las MSCs mediante citometría de flujo con el sistema FACSCanto II (Becton Dickinson, San José, EE.UU.). En este paso, se traspasaron 200,000 células a tubos de citometría, se realizaron dos lavados con PBS a 4°C para eliminar restos de medio de cultivo y se centrifugaron a 277g durante 5 minutos. Para evitar uniones inespecíficas de los anticuerpos, las muestras se incubaron durante 15 minutos con 40 µg/mL de inmunoglobulina G a temperatura ambiente. Posteriormente, las células se incubaron durante 30 minutos a 4°C en oscuridad con 10 µL de cada uno de los anticuerpos CD90 (APC), CD73 (PECy7), CD105 (PE), CD45 (APC/Cy7), CD34 (PerCPCy5.5), HLA-DR (Azul Pacífico) y HLA-ABC (FITC). Por último, las células se centrifugaron a 300g durante 6 minutos, se resuspendieron en 0.2 mL de PBS y se analizaron los datos con el software FlowJo vX.7.0 (Treestar, EE.UU.).

- **Diferenciación multilinaje**

Para evaluar la capacidad de diferenciación de las células aisladas del cordón umbilical humano, se indujo su diferenciación hacia adipocitos, osteoblastos y condroblastos. Como control positivo, se utilizaron células MSC derivadas de tejido adiposo humano y de médula ósea (ver figura 30). *Para inducir la diferenciación adipogénica*, se sembraron las células en placas de 24 pocillos a una densidad de 5×10^4 células por pocillo, alcanzando una confluencia del 60%. Las células se cultivaron en medio inductor de diferenciación adipogénica (*StemPro Adipogenesis Differentiation Kit, Life Technologies*) durante 21 días. Transcurrido este periodo, se lavaron con PBS y se fijaron con metanol frío a -20°C durante 10 minutos. La diferenciación hacia adipocitos se evidenció mediante tinción con Oil Red O (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.)* durante 20 minutos, seguida de un lavado con agua destilada. Posteriormente, se contra tiñeron con hematoxilina de Gill III durante 20 minutos y se lavaron para retirar el exceso de colorante. El colorante Oil Red O, que tiene alta afinidad por los lípidos, tiñó de rojo las grandes vacuolas lipídicas formadas en el citoplasma celular durante la diferenciación de las WJ-MSCs hacia adipocitos.

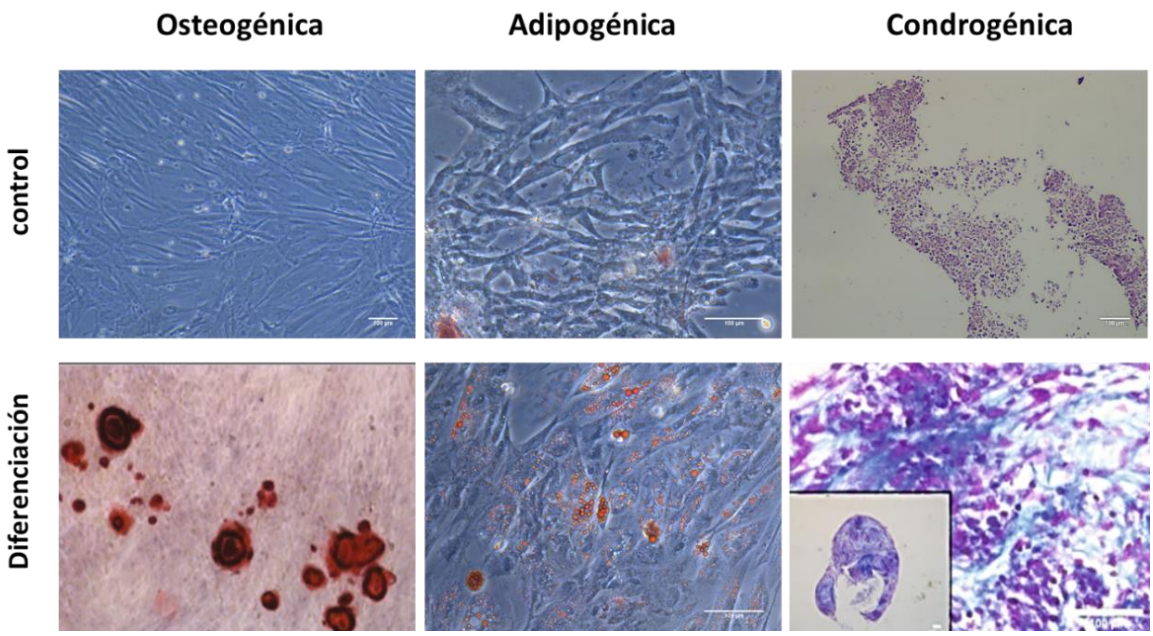


Figura 30: Capacidad de diferenciación de las WJ-MSCs. Se indujeron WJ-MSCs cultivadas (pasajes 5-6) hacia linajes osteogénicos (tinción Alizarin Red-S) y adipogénicos (tinción Oil Red O) y diferenciación condrogénica, los gránulos de WJ-MSCs se incubaron en medios de inducción condrogénica y las micromasas se evaluaron mediante tinción Tricrómica de Masson (azul). **Fuente**: *Dra. Mariana Cañas Arboleda.*

Para la diferenciación osteogénica, las células se sembraron como se describe anteriormente y se expusieron a un medio de diferenciación osteogénica (*StemPro Osteogenesis Differentiation Kit, Life Technologies).* La diferenciación se evidenció mediante tinción con Alizarin Red-S (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.*), específica para depósitos de calcio, que aparecen teñidos en negro y rojo en células diferenciadas hacia osteoblastos. Para la diferenciación condrogénica, se centrifugaron 1x10^6 células a 500g durante 5 minutos a 10°C y se resuspendieron en medio de diferenciación condrogénica (*StemPro Chondrogenesis Differentiation Kit, Life Technologies*). Los sedimentos se incubaron a 37°C y 5% de CO2 durante 21 días. Luego, se lavaron tres veces con PBS para eliminar restos de fijador, se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 24 horas y se incluyeron en parafina. Se prepararon secciones de 4 µm y se tiñeron con Tricrómica de Masson para evaluar la presencia de colágeno (azul) y células condroides.

Las células provenientes de este estudio fueron sometidas a criterios adicionales para medir su potencial de diferenciación, descritos a seguir:

- **Análisis de la expresión génica mediante reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real con transcripción reversa (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)**

La extracción de ARN total se realizó en las WJ-MSCs antes y después de su cultivo en condiciones de diferenciación. El análisis de RT-PCR se utilizó para confirmar que, tras una estimulación específica, las WJ-MSCs son capaces de diferenciarse en linajes osteogénicos, adipogénicos y condrogénicos, además de mostrar un patrón de expresión génica similar al observado en AD-MSCs y BM-MSCs. En consecuencia, las WJ-MSCs presentan un potencial multilinaje, por lo que podrían emplearse con fines regenerativos en la ingeniería de tejidos. Para el análisis de RT-PCR, el ARN total diferenciado y no diferenciado de las WJ-MSCs se aisló utilizando un kit PureLink RNA Mini (*Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EE. UU.),* siguiendo el protocolo del fabricante. La concentración y la calidad del ARN se evaluaron con un instrumento NanoDrop-1000 (*Thermo Scientific NanoDrop™ 2000/2000c*).

El ADN complementario se sintetizó mediante transcripción inversa del ARN total utilizando el kit de síntesis de primera cadena de ADNc SuperScript™ IV (*Invitrogen, San Diego, CA, EE. UU.*), seguido de qRT-PCR en un sistema de PCR en tiempo real 7500 Fast (*Applied Biosystems, California, EE. UU.),* usando ensayos de expresión génica TaqMan (*Applied Biosystems, California, EE. UU*.). Los genes analizados incluyeron los marcadores específicos de hueso SPP1 (*fosfoproteína 1 secretada, Hs00959010_m1*) y BGLAP (*osteocalcina, Hs01587814-g1*), los genes específicos de tejido adiposo FABP4 (Hs01086177_m1) y PPARG (*Hs01115513_m1*), los genes específicos de cartílago COMP (*matriz oligomérica de la matriz del cartílago, Hs00164359_m1*) y FMOD (*fibromodulina, Hs00157619_m1*), así como los genes de referencia HPRT (*Hs02800695_m1*) y β-actina (*Hs01060665_g1*). La eficiencia de la PCR para cada gen se determinó mediante la curva de calibración usando la fórmula E = 10½-1/pendiente − 1. La expresión relativa se calculó mediante el método $2^{-\Delta\Delta CT}$.

- **Evaluación capacidad de inhibición de linfocitos $TCD3^+$ mediante el uso de WJ-MSCs**

A partir de muestras de cordón umbilical, las células fueron expandidas en DMEM suplementado con 10% de suero humano o suero fetal bovino, y se evaluó su capacidad para inhibir linfocitos $TCD3^+$. Brevemente, se cocultivaron WJ-MSCs confluentes al 70-80% junto con células mononucleares de sangre periférica (MNC) en una proporción de 5×10^4 WJ-MSCs por pocillo en placas de 24 pocillos a 37°C y 5% de CO_2 durante 24 horas. Las MNC se aislaron mediante separación por gradiente de densidad de Ficoll Paque (GE Healthcare) y se añadieron a las WJ-MSCs cultivadas

en presencia de microesferas conjugadas con anticuerpos anti-CD2/CD3/CD28 (*Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Alemania*). Se utilizaron MNC basales no estimuladas y estimuladas con anti-CD2/CD3/CD28 como controles. Los cocultivos de MNC-WJ-MSCs activados se incubaron durante 72 horas a 37°C y 5% de CO_2. El efecto inhibidor de las WJ-MSCs sobre la proliferación de linfocitos se determinó mediante recuentos absolutos de células TCD3+ en un citómetro de flujo. Los datos se analizaron con el software FlowJo vX.7.0 (TreeStar, EE. UU.). La capacidad de inhibición de los linfocitos $TCD3^+$ fue de ≤87%.

Además, estudios previos con esta línea celular, descritos por Cruz-Barrera et al. (2018), evaluaron el efecto de las WJ-MSCs producidas en el Instituto sobre la regulación y función del fenotipo del macrófago en ambientes inflamatorios. Este estudio demostró que las WJ-MSCs son capaces de inducir un efecto supresor en los monocitos en ambientes inflamatorios, favoreciendo la modulación de respuestas inmunes y potenciando la reparación/regeneración tisular (298). Después de la fase de recolección, procesamiento y caracterización celular, las WJ-MSCs fueron crioconservadas en criotubos con 2×10^5 células/mL en un medio criogénico compuesto por 10% de dimetilsulfóxido (*DMSO; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.)* y 40% de PBS, y se mantuvieron en nitrógeno líquido hasta la fecha indicada para su uso.

❖ Trasplante de intravítreo de WJ-MSCs el modelo animal

- ***Preparación de las células WJ-MSCs para el uso quirúrgico***

Las células cultivadas en la Unidad de Terapia Celular del Instituto Distrital de Ciencia Biotecnología e Innovación en Salud (IDCBIS) fueron transportadas en cadena de frío hasta la Escuela Superior de Oftalmología del Instituto Barraquer de América. Como parte del protocolo previo a la aplicación intravítrea, las células crioconservadas se descongelaron rápidamente (<2 min) en un baño maría a 37°C y se lavaron con 5 mL de medio de cultivo basal, seguido de una centrifugación durante 5 minutos. Posteriormente, las células se lavaron dos veces con PBS. El Instituto proporcionó un reporte de conteo y viabilidad celular del vial con la suspensión celular, garantizando la calidad de las células utilizadas: *concentración total celular $9.58x10^5 \pm 8.88x10^4$ cells/mL; viabilidad 99.2 ±0.546%, concentración de células vivas $9.50 \times 10^5 \pm 8.39x10^4$ cells/mL y estudio microbiológico negativo*.

- ***Aplicación intravítrea de las células WJ-MSCs***

Los animales fueron manipulados de acuerdo con el protocolo descrito anteriormente. Se realizó la aplicación de WJ-MSCs en el ojo experimental de los grupos 2 y 3 en la semana 7 del estudio, previa suspensión del uso de glucocorticoides en la semana 5. Todos los animales fueron anestesiados para el procedimiento. Antes de la aplicación de las WJ-MSCs, se realizó la antisepsia del globo ocular con povidona yodada diluida al 5%, se aplicó una gota de anestésico tópico y se utilizó un paño de campo quirúrgico desechable. Con el auxilio de un microscopio quirúrgico (*Zeiss, Alemania*) y un blefaróstato, se aplicó intravítrea una suspensión de 1×10^5 WJ-MSCs en 100 µL mediante una jeringa de insulina acoplada a una aguja de calibre 30G (ver figura 31). La aguja se introdujo 4 mm posterior al limbo corneal lateral, a través de la esclerótica en la cavidad vítrea en la región de *pars plana*. Las células fueron inyectadas lentamente (aproximadamente 1 minuto), tomando la precaución de evitar el contacto con el cristalino y el daño de las venas del vórtice, lo que podría causar inflamación ocular y catarata. Para evitar la salida de la solución aplicada en el vítreo, se aplicó presión con un isopo estéril en la zona durante 1 minuto. Posteriormente, se administró 0,1 mL de solución salina equilibrada estéril (BSS) de forma intravítrea en el ojo de control.

Figura 31: Técnica de aplicación intravítrea de WJ-MSCs. suspensión celular concedida por laboratorio, dosis de aplicación y técnica del procedimiento. **Fuente**: *Archivo personal.*

- Para el cumplimento del objetivo específico 2: "**Describir los cambios morfológicos y funcionales observados en la retina y el nervio óptico en el modelo experimental de HO antes y después de la intervención con MSCs**", se describe el protocolo a seguir:

❖ ***Tomografía de Coherencia Óptica (OCT)***

El estudio de OCT se realizó en todos los grupos de animales antes de los procedimientos de inducción de HO y de flash-PEV. Los OCT se realizaron en los grupos G1 y G3 en las semanas 1, 4 y 9, y en el grupo G2 en las semanas 1 y 9. Todos los OCT fueron realizados por el mismo investigador, con la asistencia de un auxiliar para el posicionamiento de los animales. Los animales no fueron anestesiados para este estudio. El examen se realizó tras la dilatación pupilar con Tropicamida al 1% y la aplicación de lágrimas artificiales (*Splash Tears, Sophia, Colombia*). Una vez posicionado correctamente el animal, se ajustó el globo ocular y se enfocó adecuadamente el ojo en la pantalla, visualizando simultáneamente la imagen retiniana y ajustando el foco según el defecto refractivo del animal, si era necesario (ver figura 32).

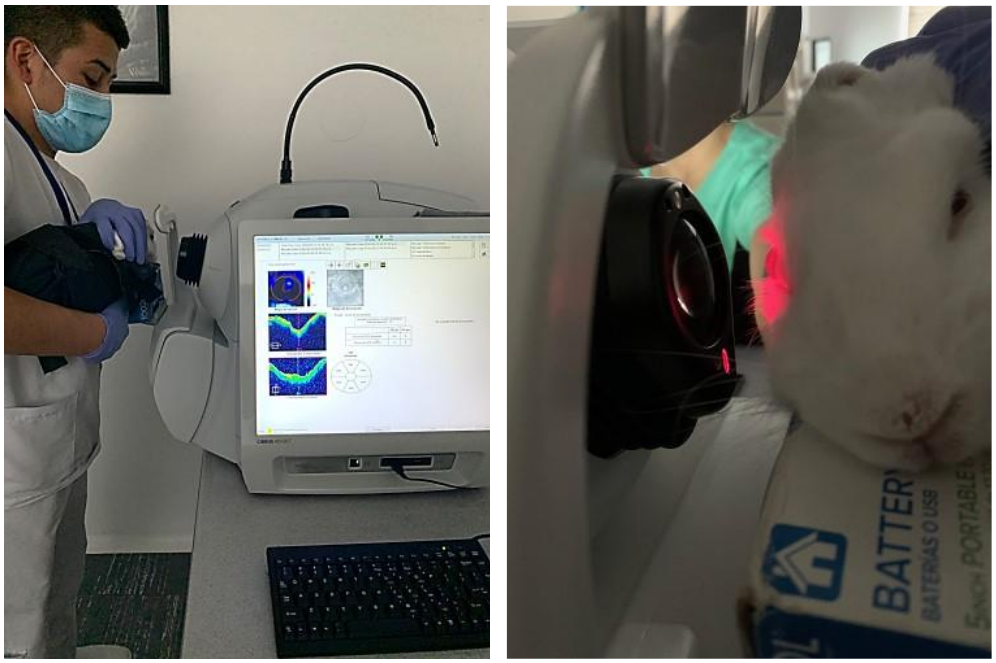


Figura 32: Tomografía de Coherencia Óptica. Posicionamiento del animal para el procesamiento de las imágenes. Dispositivo Cirrus HD-OCT 4000 Zeiss. **Fuente**: *Archivo personal.*

Las imágenes se recolectaron utilizando un dispositivo Cirrus HD-OCT 4000 Zeiss (*versión de software 3.0.0.64*) con el programa de Cubo del Disco Óptico 200x200 y protocolos CGRs 512 x 128. Una vez centrado y correctamente enfocado el nervio óptico, se procedió a la captura de la imagen en un tiempo de 1,5 segundos. Se realizaron exploraciones B paracentrales ubicadas en el disco óptico ventral a 3 mm (*zona visual Streak*) de la cabeza del nervio óptico (CNO) (ver figura 33).

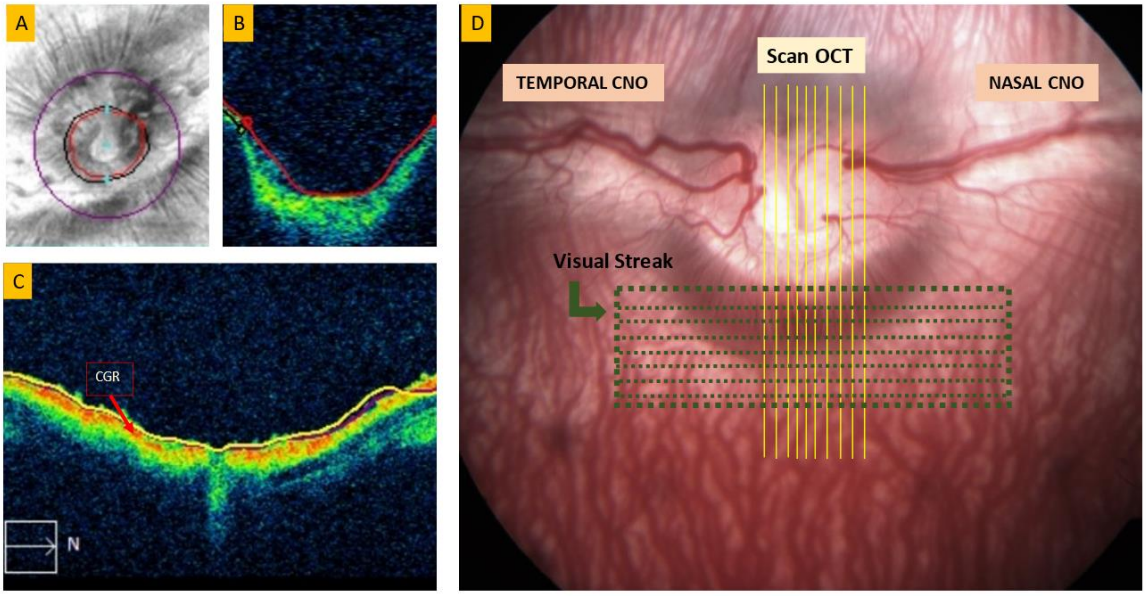


Figura 33: Descripción de las imágenes OCT: **A)** Imagen frontal que muestra el margen del disco (negro exterior) y el margen de la copa (rojo interior) detectadas y dibujadas con el software Cirrus HD-OCT. La región entre los márgenes de la copa del disco representa el área del borde neurorretiniano (mm^2); la región dentro del margen de la copa corresponde al área de la copa (mm^2); el área del disco (mm^2) es el área del borde más el área de la copa; **B)** Tomografías verticales del mismo ojo que representan puntos de referencia para el margen de copa; **C)** Mediciones del espesor retiniano y análisis de células ganglionares retina: se obtuvieron a partir de escaneos OCT verticales que pasaron por el centro y el borde nasal de la CNO en el área denominada cubo macular y **D)** Imágenes de fondo de ojo en color de un conejo blanco de Nueva Zelanda: Se utilizó el modo de barrido lineal para obtener barridos verticales que pasan por el centro de la ONH, perpendiculares a los principales rayos medulares de la retina e incluyendo la zona denominada visual *Streak.* **CNO**: cabeza del nervio óptico. **Fuente**: *Archivo personal.*

Solo se utilizaron exploraciones con una señal de intensidad superior a 5 y sin movimientos oculares para el análisis. Se realizaron escaneos axiales y transversales de 5 µm y 15 µm, respectivamente, ajustando los círculos de escaneo y utilizando funciones de calibración para medir la CNO. Los parámetros analizados de la CNO incluyeron: grosor promedio de la capa de fibras nerviosas de la retina (CFNR), área del disco, área del borde, grosor del borde vertical, la relación

vertical y horizontal entre la copa y el disco, y el volumen de la copa. El análisis de la capa de células ganglionares de la retina (CCGR) se midió utilizando la aplicación de cubo macular en la zona visual Streak. Dado que esta investigación se realizó en un modelo experimental animal, al finalizar el estudio, se desinfectó el aparato con el producto indicado por el fabricante.

- **Evaluación de la respuesta pupilar fotocromática**

Para llevar a cabo este estudio, se implementó el mismo protocolo utilizado en la fase piloto de la investigación, garantizando así la coherencia metodológica a lo largo de todo el estudio y facilitando la comparación de resultados entre las distintas etapas. Se planificaron evaluaciones en intervalos específicos durante el estudio principal, programadas para las semanas 1, 3, 6 y 9, permitiendo una observación detallada de la evolución de los cambios a lo largo del tiempo, lo que puede revelar tendencias o patrones significativos en los datos recopilados. Antes de los procedimientos de inducción de HO, se realizaron evaluaciones de referencia de la respuesta pupilar fotocromática, flash-PEV y OCT.

- **Retinografía de la retina**

Para evaluar las posibles alteraciones en el segmento posterior del ojo, se realizaron fotografías de fondo de ojo en todos los animales estudiados, utilizando el equipo Zeiss Ff-450 Plus IRu Fundus Camera. Durante el proceso de captura de imágenes, los animales se sujetaron cuidadosamente para garantizar la estabilidad y se posicionó el ojo a una distancia de 10 cm del equipo fotográfico. Este software permite realizar mediciones precisas y reproducibles de las estructuras oculares en las imágenes capturadas. Para la medición del área de la copa y del disco ópticos, se empleó el programa ImageJ app (v.1.53e, Wayne Rasband, EE. UU.) (ver figura 34). Es importante destacar que en este procedimiento no se utilizó anestesia en los animales, minimizando así cualquier posible influencia de la sedación en los resultados obtenidos.

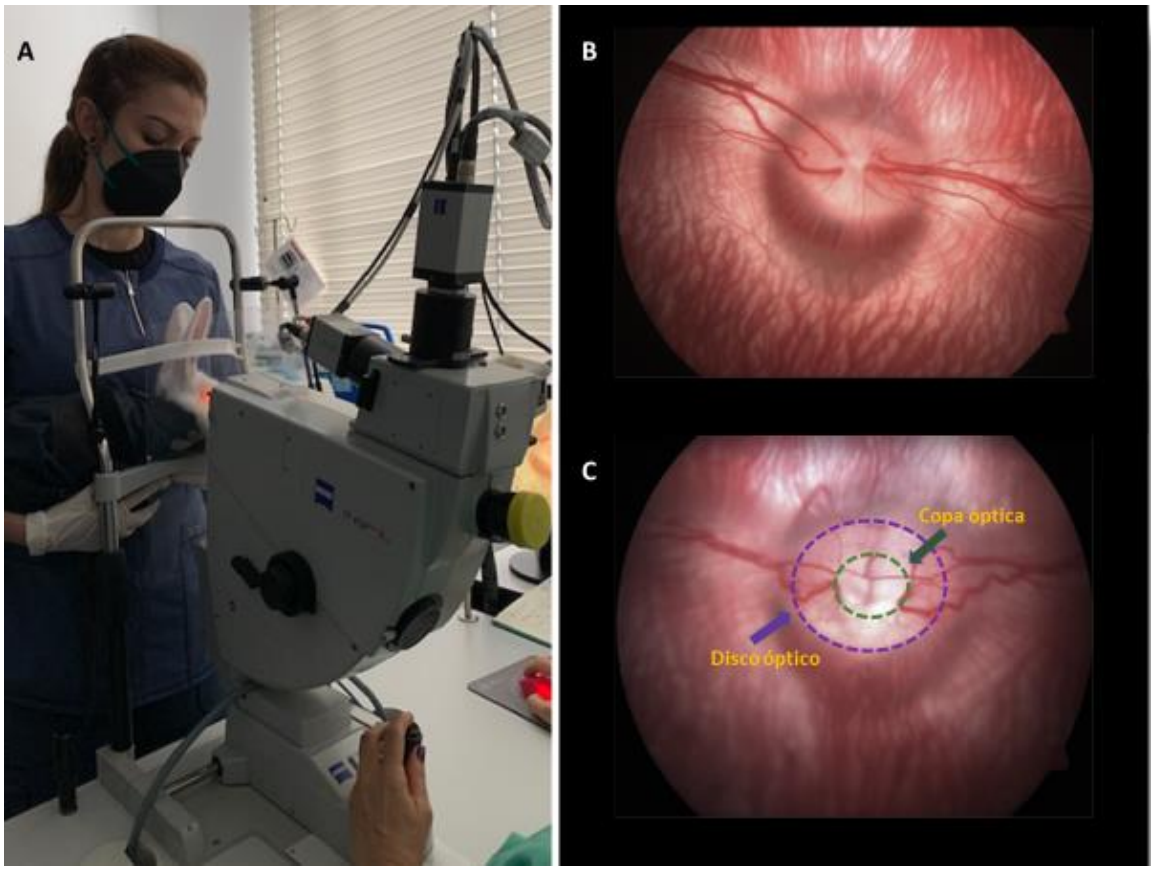


Figura 34: Técnica de Retinografía realizada en conejo Nueva Zelanda. A) Posicionamiento y contención del animal en el equipo retinográfico; **B)** Visualización imagen normal fondo de ojo y **C)** Delimitación de las áreas de referencia en la zona del nervio óptico. **Fuente**: *Archivo personal.*

- ***Potenciales Visuales Evocados Flash (flash-PEV)***

Para evaluar la función de la retina y las vías visuales en todos los grupos de estudio durante las semanas 1 y 9, se utilizó el flash-PEV. Siguiendo los estándares de la Sociedad Internacional de Electrofisiología Clínica de la Visión (ISCEV), no fue necesaria la adaptación a la oscuridad, aunque se realizó un breve período de adaptación de 5 minutos para minimizar el estrés en los animales. Todos los procedimientos se realizaron bajo anestesia (según el protocolo descrito anteriormente) y después de dilatar las pupilas con Tropicamida al 1% (*Mydriacyl® 10 mg/mL, Alcon*). Para la medición de los trazados, se utilizó el aparato RetinoGraphics BPM-300 ERG/VEP (Retinographics, EE.UU.). Los registros se realizaron en ambos ojos. Durante los registros, los animales se colocaron en decúbito esternal y se mantuvo el ojo abierto mediante un blefaróstato. Las respuestas se obtuvieron estimulando solo uno de los ojos, mientras que el otro ojo se cubrió para evitar la estimulación por luz. Las señales de flash-PEV se registraron utilizando una aguja de acero inoxidable

como electrodo activo, insertada debajo de la piel sobre el área de la corteza visual, a medio camino entre las orejas. Los electrodos de referencia y de tierra se insertaron detrás de las orejas (ver figura 35). Los parámetros de registro incluyeron una base de tiempo de 5 ms/Div, una sensibilidad de 2 µV/Div, un estímulo único, un intervalo entre pruebas de 2 segundos y una intensidad de estímulo de 3.0 cd-s/m². Se promediaron 64 respuestas para el ojo derecho. El análisis flash-PEV se basó en la amplitud (P2) y la latencia (N2), que se calcularon automáticamente mediante un software especializado.

Figura 35. Manejo del animal para trazados de flash-PEV. Corta adaptación a la oscuridad para disminuir estrese del animal. Electrodos utilizados y posición del aparato RetinoGraphics BPM-300 ERG/VEP (Retinographics, USA) en conejo Nueva Zelanda. **Fuente**: *Archivo personal.*

- Para el cumplimento del objetivo 3: ***"*Evaluar el efecto neuroprotector de la aplicación de MSCs en la retina y nervio óptico, así como su relación con las respuestas inmune e inflamatoria.**", se utilizó el protocolo descrito a seguir:

❖ *Toma de Muestras y Procesamiento de Tejidos*

✓ *Obtención del Humor Acuoso*

Se recogieron muestras de humor acuoso en todos los grupos de la investigación durante las semanas 1, 3 y 9 del estudio. Todas las muestras se obtuvieron antes del procedimiento de inducción de HO (realizado semanalmente) y la aplicación intravítrea de WJ-MSCs, para evitar contaminación y alteración de las muestras. Todos los animales fueron anestesiados para el procedimiento. La paracentesis de la cámara anterior se realizó previa desinfección e instilación de colirio anestésico (ver figura 36). Las muestras de humor acuoso (0,1 mL) se aspiraron mediante paracentesis limbar utilizando una jeringa de 1 mL con una aguja de calibre 30G. Para disminuir complicaciones como infecciones y desprendimiento de retina, se evitó el contacto con otras estructuras intraoculares, como el iris y la cápsula anterior del cristalino. Tras extraer la aguja de la cámara anterior, se realizó la prueba de Seidel. Las muestras se transfirieron inmediatamente a un crio tubo, se colocaron en cadena de frío y se transportaron al laboratorio para su procesamiento y almacenamiento a -80°C.

Figura 36: Técnica de colecta de muestras de humor acuoso. Posicionamiento del animal en el momento de la técnica quirúrgica. Paracentesis de humor acuoso en un conejo Nueva Zelanda. **Fuente**: *Archivo personal.*

✓ ***Obtención del Humor Vítreo***

Se obtuvieron muestras de humor vítreo en todos los grupos de la investigación durante la semana 9 del estudio. Todas las muestras se recogieron después de la colecta de humor acuoso y antes del estudio histopatológico. Para la recolección del humor vítreo, se utilizó una aguja de 27G, insertada a 4 mm del limbo corneal temporal, atravesando la esclerótica en dirección a la cabeza del nervio óptico. Se aspiraron 0,7-0,9 mL de humor vítreo de cada ojo. Las muestras se identificaron correctamente, se transfirieron a un crio tubo y se almacenaron a -80°C hasta su procesamiento.

❖ ***Evaluación de la Cinética inflamatoria***

Para el cumplimiento del objetivo propuesto: "*Evaluar el efecto neuroprotector de la aplicación de MSCs en la retina y nervio óptico y su relación con las respuestas inmune e inflamatoria.",* se empleó las técnicas de ELISA, citometría de flujo, histopatología e Inmunohistoquímica en las muestras estudiadas.

➢ **Inmunoensayo enzimático (ELISA)**

La técnica de ELISA se realizó en los ojos experimentales y ojos control en todos los grupos de estudio (ver figura 37). Las muestras de humor acuoso y vítreo se procesaron utilizando kits comerciales de ELISA tipo sándwich, siguiendo las instrucciones del fabricante (ver tabla 5). Las muestras se descongelaron previamente a temperatura ambiente para su procesamiento.

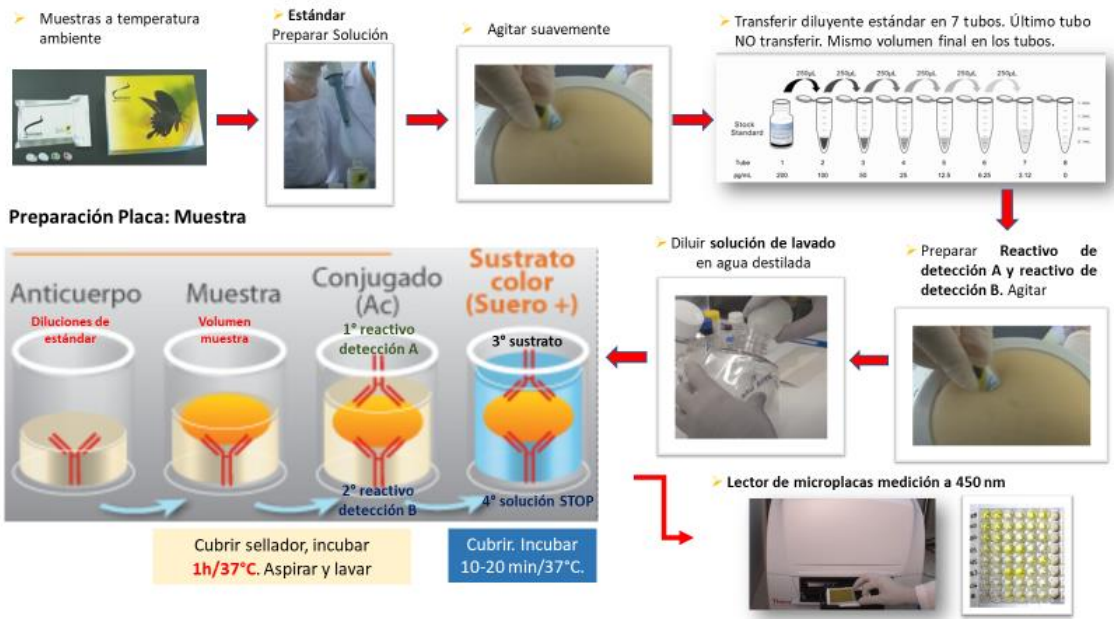


Figura 37: Protocolo utilizado para la realización de la técnica de Elisa. Distintas concentraciones de soluciones fueron utilizadas de acuerdo las instrucciones del fabricante de cada kit.

Tabla 5: Kits comerciales utilizados para realizar las técnicas de ELISA.

Citoquinas	Marca	Catalogo	Sensibilidad (pg/mL)	Rango detección (pg/ml)	Muestra procesada	Volumen Muestra
TNF-α	Elabscience®	E-EL-RB0011	9.38	15.63-1000	Acuoso	100µL
IL-6	Abbexa®	abx052084	<1.35	3.12-200	Acuoso	25µL
IL-8	Abbexa®	abx155079	<5.7	15.6-1000	Acuoso	100µL
IFN-γ	BD Biosciences®	555138	≥10	≥15	Vitreo	100µL
TGF-β1	Cloud-clone corp.	MAR124R	<6,2	15.6-1000	Vitreo	100µL
IL-10	Elabscience®	EL-RB0487	9.38	15.6-1000	Vitreo	100µL

- **Citometría de Flujo**

La técnica de citometría de flujo se llevó a cabo en los ojos experimentales y los ojos de control en todos los grupos estudiados. Las muestras de humor acuoso se procesaron inmediatamente después de la recolección en las semanas 1, 3 y 9 para discriminar las poblaciones celulares mediante dispersión frontal (FSC), que refleja el tamaño de la célula, y dispersión lateral (SSC), que refleja la complejidad interna celular.

Primero, se dividieron las muestras de humor acuoso, calculando el volumen final en dos tubos distintos debidamente identificados para la determinación de subpoblaciones celulares y citoquinas. Las muestras para citoquinas se congelaron a -80°C para su posterior análisis (ver figura 38). Las muestras se centrifugaron durante 5 minutos a 700 rpm y se analizaron mediante citometría de flujo utilizando un citómetro FACSCanto II™ (BD Biosciences™) para discriminar las poblaciones celulares por tamaño y complejidad. En las semanas 3 y 9 del estudio, se añadieron anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromos específicos para los antígenos de superficie celular: anti-CD3+ FITC (Anti-CD3 zeta anticuerpo [H146-968] (FITC), ab91493, Abcam, Cambridge, MA). Los análisis se realizaron con el software FC EXPRESS 7 (Cytosens). Después de calcular el volumen de las muestras, se añadieron 100 µL de anticuerpo anti-CD3+ (concentración final de 4 µg/mL) y se mezcló la suspensión celular. La incubación se realizó durante 30 minutos a 4°C en oscuridad. Posteriormente, se adicionaron 400 µL de solución FACS Flow, seguidos de una centrifugación a 700 g durante 5 minutos, y se realizó un único lavado debido a la baja cantidad de células encontradas en las muestras. Finalmente, se resuspendió en 100 µL de solución FACS Flow para la lectura en el citómetro.

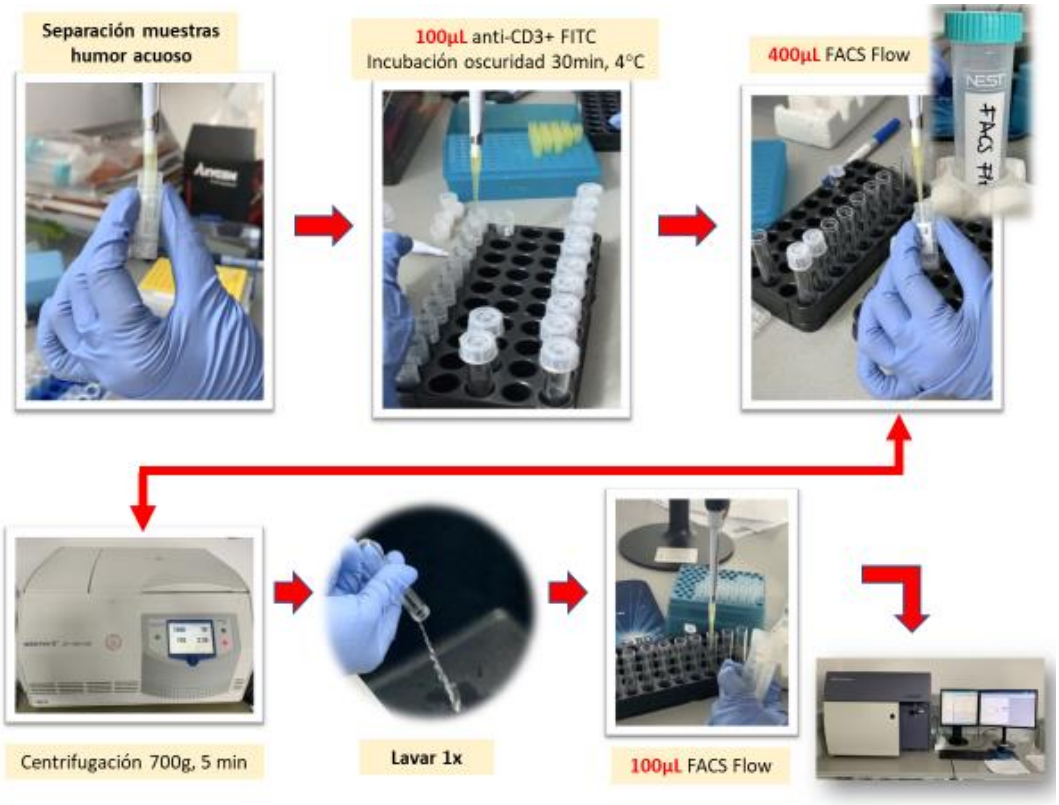


Figura 38: Metodología utilizada para el procesamiento de las muestras de humor acuoso en citometría de flujo. Fuente: *Archivo personal.*

- **Histología e Inmunohistoquímica**

Transcurrido el período de 9 semanas, después de completar los estudios propuestos, los animales fueron anestesiados y eutanasiados conforme al protocolo descrito anteriormente. El estudio histológico e inmunohistoquímico de la retina y el nervio óptico se realizó en los ojos experimentales y de control en todos los grupos estudiados (ver figura 39). Se utilizó el protocolo previamente descrito para la técnica de histología. Este estudio permitió observar los cambios estructurales en la retina y el nervio óptico después de la aplicación intravítrea de WJ-MSCs en el modelo experimental. Se estableció un sistema de puntuación histológico para evaluar la repetibilidad y severidad de las lesiones en la retina y el nervio óptico, basado en criterios publicados en la literatura científica (299–301). Los criterios de puntuación para las lesiones fueron: (0) Normal; (1) Leve: <24% afectado; (2) Moderado: 25%-50% afectado; y (3) Severo: ≥51% afectado.

Figura 39: **Material utilizados para las técnicas de histología e inmunohistoquímica en los animales.** Muestras de los animales acondicionadas en frascos con solución de formaldehído tamponado al 10%. **Fuente**: *Archivo personal.*

Se emplearon técnicas inmunohistoquímicas indirectas para el procesamiento de las muestras, siguiendo las instrucciones del fabricante (ver tabla 6). En esta técnica, la señal de la reacción antígeno-anticuerpo se revela incorporando varias capas de anticuerpos. En primer lugar, se desparafinizaron las secciones de retina, seguidas de deshidratación y desenmascaramiento del antígeno con TRS (pH 9, 1X) (*DakoMR Target Retrieval Solution High pH 10x concentrado, Dako, EUA*). Posteriormente, se bloquearon las peroxidasas endógenas, se incubaron las muestras con el anticuerpo primario durante la noche a 4°C, se lavaron con TBS *(EnvisionMR Flex Wash Buffer 20x,*

Dako, EUA) y se aplicó el anticuerpo secundario. Tras un segundo lavado, se añadió el sustrato peroxidasa-cromógeno y se realizó una contra-tinción con hematoxilina de Mayer. Las retinas se montaron planas sobre cubreobjetos y se examinaron con un microscopio óptico. Las imágenes de cada sección se analizaron y se utilizaron criterios de puntuación para las lesiones de la retina y del nervio óptico: (0) Normal: sin marcación; (1) Leve: <24% de inmunorreactividad; (2) Moderado: 25%-50%; y (3) Grave: ≥51%. Para la evaluación de los resultados, se diseñó un estudio ciego en el que participaron dos especialistas en morfología.

Tabla 6: Anticuerpos primarios y secundarios. Detalle de los anticuerpos empleados en el estudio, nombre, casa comercial, referencia y concentración de trabajo empleada.

Marcadores	Marca	Catalogo	AC secundario	Dilución
Rabbit anti-GFAP	Novus Biologicals®	NB300-14	IgG conjugado con biotina	1:1000
Anti-CD3	Abcam ®	ab11089	Anti-rata de cabra	1:200
Anti-CD4	Santa Cruz Biotechnology	sc-13573 (GK1.5)	Anti-rata de cabra	1:100
Anti-CD8	Santa Cruz Biotechnology	Sc-1181 (UCH-T4)	Anti-IgG de ratón	1:100

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis de los resultados, se utilizaron estadísticas descriptivas para evaluar los datos continuos, que se expresaron como media, desviación estándar (DE) y rango intercuartílico, considerando la variación entre los grupos y el tamaño de la muestra. Los ojos de control de todos los grupos se agruparon para el análisis. En cuanto al análisis estadístico de las diferencias entre los grupos a lo largo de las semanas en relación con la PIO, se utilizó ANOVA de una vía o ANOVA de Kruskal-Wallis, según la distribución de los datos. Para evaluar los cambios durante las semanas en los grupos en las pruebas flash-VEP, RPF, análisis de citoquinas, linfocitos y OCT, se aplicó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilks para determinar la distribución de los datos. En los casos de normalidad, se empleó ANOVA de medidas repetidas; en casos de anormalidad, se utilizó ANOVA de Friedman. Si el ANOVA de medidas repetidas mostraba diferencias estadísticamente significativas, se realizaron análisis post hoc utilizando las pruebas de Tukey y Bonferroni. Dado que el supuesto de homocedasticidad se cumplió en todos los casos, no fue necesario verificarlo. Por otro lado, cuando el ANOVA de Friedman mostró diferencias significativas, se utilizó la prueba de Durbin-Conover para comparaciones entre grupos.

Para analizar las diferencias entre los grupos a lo largo de las semanas en las pruebas flash-VEP, RPF y OCT, se utilizó ANOVA de una vía o ANOVA de Kruskal-Wallis, según la distribución de los datos. Cuando el ANOVA de una vía mostró diferencias significativas, se realizó la prueba de homocedasticidad de Levene, y según su resultado, se definió la prueba post hoc (Tukey para varianzas iguales y Games-Howell para varianzas diferentes). En el caso de ANOVA de Kruskal-Wallis, las diferencias entre los grupos se evaluaron mediante la prueba de Dwass-Steel-Critchlow-Fligner. Además, se realizó un análisis de correlación entre las variables de amplitud y latencia de flash-VEP, el diámetro pupilar en respuesta a la luz azul y PIO con CFNR. Se utilizó la correlación de Pearson o Spearman, según la distribución de los datos. Para los análisis de resultados sin seguimiento completo con OCT, se utilizó la prueba T para muestras pareadas o la prueba de Wilcoxon para muestras pareadas, según la distribución. En relación con el análisis de inmunohistoquímica e histología, se empleó la prueba no paramétrica de Wilcoxon para comparar rangos medios y el análisis de regresión lineal. Finalmente, para analizar las muestras de humor acuoso y vítreo y la presencia de linfocitos T, se utilizó la prueba T de Student para muestras pareadas.

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software **R Core Team** (2020) y **Jamovi Versión 2** (Jamovi 2021). El nivel de significancia establecido fue $P \leq 0.05$.

5. INTRODUCCIÓN A LOS CAPÍTULOS

El glaucoma representa un problema significativo de salud pública, siendo la segunda causa principal de ceguera después de las cataratas, y esta ceguera es generalmente irreversible (302). e estima que más de 111 millones de personas padecerán esta enfermedad para 2040, de las cuales 8.4 millones quedarán ciegas (303). En ciertos grupos étnicos, estas cifras podrían superar el 20% (304). Las personas mayores de 60 años, aquellas con antecedentes familiares de glaucoma, usuarios de esteroides, diabéticos, así como individuos con miopía alta, hipertensión o lesiones oculares, presentan un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad (303). Además de sus implicaciones para la salud, el glaucoma conlleva repercusiones económicas significativas (305). El principal desafío del glaucoma radica en su condición de enfermedad sin cura definitiva, lo cual se refleja en el creciente número de pacientes afectados (44,306). A menudo, cuando se detecta en consulta, la enfermedad ya se encuentra en un estadio avanzado, con un deterioro considerable de la agudeza visual. Aunque la reducción de la PIO es actualmente el enfoque principal del tratamiento, la neuropatía glaucomatosa puede seguir progresando y causar pérdida visual (303). Las terapias actuales, tanto médicas como quirúrgicas, buscan reducir la PIO, pero su éxito es limitado en cuanto a detener o al menos retrasar la degeneración neuronal, lo que ha llevado a la necesidad de desarrollar terapias más eficientes, especialmente con un efecto neuroprotector (307).

En la búsqueda de terapias neuroprotectoras, el trasplante de células madre mesenquimales (MSCs) está emergiendo como una herramienta prometedora para la reparación del sistema nervioso central (308). Esto se debe a su baja antigenicidad, efectos antiinflamatorios, propiedades inmunomoduladoras y secreción de factores tróficos (309,310). Por lo tanto, surge la iniciativa de evaluar el efecto neuroprotector de las MSCs derivadas de la WJ-MSCs como una posible terapia para el glaucoma, dado que, a pesar de un tratamiento adecuado, la enfermedad a menudo continúa progresando. La patogenia de la neuropatía glaucomatosa sigue siendo un tema de debate en la comunidad científica. Aunque la elevada PIO ha sido considerada la causa principal del daño glaucomatoso, se han propuesto diversas hipótesis, como el bloqueo del transporte axonal retrógrado, la isquemia de la cabeza del nervio óptico, el efecto directo de la presión en las células ganglionares de la retina (CGRs), la muerte por excitotoxicidad y, más recientemente, reacciones inflamatorias de tipo autoinmune y estrés oxidativo (311). Todos estos mecanismos resultan en

daño a la cabeza del nervio óptico y muerte de las CGRs como resultado de la activación de un ambiente inflamatorio (33,312).

El ojo tiene mecanismos de protección inmune que reducen la amenaza de pérdida de visión inducida por la inflamación, ya que algunos componentes oculares, como el endotelio corneal y la retina neurosensorial, son incapaces de regenerarse o resistir la pérdida de células después de una lesión (116). Aunque el ojo se considera un sitio privilegiado para el sistema inmunitario, con una homeostasis selectivamente antiinflamatoria e inmunosupresora (120,170), la activación del sistema inmunitario intraocular puede desencadenar la expresión de citoquinas inflamatorias implicadas tanto en la fibrosis como en la muerte celular (171). Se ha descrito un desequilibrio en la producción de citoquinas Th1/Th2 involucradas en el daño o protección neuronal en la neuropatía glaucomatosa (313), sugiriendo una posible relación con una reacción inmune y/o inflamación crónica (204,314). A pesar de los diferentes estudios sobre el análisis de citoquinas en pacientes glaucomatosos, aún no se han descrito en la literatura las posibles alteraciones en los perfiles de citoquinas y su posible correlación con la respuesta inmunológica frente a la aplicación intraocular de un agente potencialmente neuroprotector.

La terapia con glucocorticoides (GCs) se administra para reducir las manifestaciones inflamatorias intraoculares; sin embargo, puede causar HO como efecto secundario (315). El glaucoma inducido por GCs tiene similitudes clínicas, morfológicas y moleculares con el GPAA (316). A diferencia del GPAA, la terapia con GCs puede aumentar la PIO sin dolor en algunas personas, y la HO es generalmente reversible tras la interrupción del fármaco. Sin embargo, la pérdida de visión y el daño estructural y funcional de la retina y el nervio óptico no son reversibles (317,318). Actualmente, no existen estudios que reporten alteraciones en los niveles de citoquinas en el microambiente ocular en este tipo de glaucoma, como se describe en el GPAA. Se conoce que los GCs disminuyen considerablemente la producción de las citoquinas IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, TNF-α e IFN-γ, así como de IL-6 e IL-8 (319). A pesar de esto, algunos estudios han informado que los niveles de algunas citoquinas en el humor acuoso no experimentan alteraciones significativas después de la aplicación de esteroides tópicos (320,321). No obstante, Cutolo et al. (322) señalan que tras suspender el tratamiento con glucocorticoides, la regulación de las citoquinas y la respuesta inmunológica puede variar en duración, dependiendo de la situación clínica específica y la respuesta individual del paciente al tratamiento. En consecuencia, se espera que el uso de esta terapia no influya de manera sustancial en los perfiles de citoquinas entre los grupos estudiados.

Actualmente, se describe que las células madre mesenquimales (MSCs) tienen la capacidad de inhibir la proliferación de ciertas células del sistema inmunológico y la producción de citoquinas proinflamatorias, anticuerpos y mediadores citotóxicos, lo que resulta en un efecto antiinflamatorio e inductor de tolerancia inmunológica (323). No obstante, no se ha reportado el uso de estas células en un ambiente inmunosupresor, como es el caso de la HO inducida por los GCs, ya que las MSCs necesitan activarse en un ambiente inflamatorio para ejercer su actividad inmunosupresora, sin la cual permanecen en estado de reposo (324). Por lo tanto, en esta investigación se espera que el modelo propuesto produzca un microambiente inflamatorio intraocular para inducir la activación celular.

Otra particularidad descrita en la patología glaucomatosa es la infiltración de linfocitos T en la retina, aunque no está claro qué subconjuntos de linfocitos T actúan como células efectoras o como iniciadoras de la neurodegeneración glaucomatosa (184). Por lo tanto, la utilización de marcadores moleculares inflamatorios ($TCD3^+/TCD4^+/TCD8^+$) para la detección de alteraciones en la respuesta inmune parece ser de vital importancia, ya que el ojo se considera un sitio de privilegio inmunológico que está dirigido a controlar los procesos inflamatorios de forma local. En este aspecto, las MSCs podrían presentar un nuevo enfoque terapéutico, ya que estas células, además de producir quimiocinas que atraen a las células inmunes activadas, son capaces de inhibir los linfocitos T mediante la inducción de la detención de la división celular y ejercer así su efecto inmunosupresor (310,324).

Existen evidencias que sugieren que el cordón umbilical es una fuente de MSCs más eficiente y segura que la médula ósea, dado que es más abundante y accesible, la técnica de extracción es menos invasiva, con un mayor rendimiento, mayor tiempo de capacidad proliferativa y mayor pluripotencialidad en comparación con las MSCs derivadas de otros tejidos adultos (310,325). Además, poseen una menor tasa de senescencia, baja inmunogenicidad, con una menor probabilidad de rechazo de trasplantes alogénicos y xenogénicos. En este estudio, se usarán WJ-MSCs cultivadas en plasma, lo que podría inducir a una mayor viabilidad y secreción de señales inmunomoduladoras y proangiogénicas, potenciando las características inmunoterapéuticas y regenerativas de esta terapia celular.

Uno de los principales desafíos que los investigadores enfrentan al estudiar esta enfermedad es la falta de disponibilidad de modelos predictivos. Esta circunstancia no solo limita la capacidad de estudio del glaucoma, sino que también interfiere en la selección de terapias que pueden tener éxito o fracaso durante la investigación clínica. Por ello, los estudios basados en modelos

experimentales con animales han sido fundamentales para comprender los mecanismos de formación y evacuación del humor acuoso, así como el mantenimiento de la homeostasis de la PIO (326). En este estudio, se inducirá HO basada en dos modelos descritos en la literatura con el uso de glucocorticoides en conejos (74,295,327), con el fin de mantener un aumento de la PIO de larga duración, además de proporcionar tanto cambios morfológicos y funcionales como inmunológicos, como los descritos en el glaucoma.

Esta investigación se fundamentó en un estudio previo de la literatura que examinó la aplicación intravítrea de células madre mesenquimales obtenidas del tejido adiposo humano. Este estudio previo demostró la capacidad de estas células para promover el proceso de curación en un modelo experimental de agujero macular en retina de conejos, mostrando resultados sobresalientes en cuanto a la reconstitución del tejido y el tiempo de regeneración posterior a la aplicación (280). Este estudio sugiere la posibilidad del uso de células madre mesenquimales en otras especies, ya que estas células presentan baja expresión de HMC-I, lo que desempeña un papel protector frente a las células asesinas naturales (NK), y carecen por completo de expresión de HMC-II y moléculas coestimuladoras CD40, CD80 y CD86 (328), lo que hace que las células evadan el reconocimiento por parte del sistema inmune.

Sin embargo, surge la pregunta sobre si estas células aplicadas intravítreas son capaces de disminuir los niveles intraoculares de citoquinas inflamatorias sin provocar un rechazo en este órgano, dado que son de diferentes especies y el ojo es un órgano inmunoprivilegiado. Esta es una pregunta importante y compleja que requiere una evaluación detallada de la respuesta inmune local y el potencial de las MSCs para modularla de manera efectiva sin desencadenar una reacción adversa. Este estudio busca proporcionar una comprensión más profunda de los mecanismos inmunológicos involucrados en la patología glaucomatosa y explorar el potencial terapéutico de las WJ-MSCs en la protección de la retina contra el daño inducido por el aumento de la PIO. Los hallazgos de este estudio podrían tener implicaciones significativas en el desarrollo de nuevas estrategias de tratamiento y prevención para el glaucoma y mejorar la calidad de vida de los pacientes afectados por esta enfermedad debilitante. Por estas razones, se identificó la necesidad de llevar a cabo estudios que no solo desarrollen un modelo experimental, sino que también permitan evaluar la progresión de la enfermedad y la influencia de la terapia celular en este modelo. Por lo tanto, el objetivo general de esta tesis se dividió en los siguientes tres capítulos:

- **CAPÍTULO 1:** *"*Diseñar y estandarizar un modelo experimental con signos tempranos de HO en conejos Nueva Zelanda."
- **CAPÍTULO 2:** "Describir los cambios morfológicos y funcionales observados en la retina y el nervio óptico en el modelo experimental de HO antes y después de la intervención con MSCs"
- **CAPÍTULO 3:** "Evaluar el efecto neuroprotector de la aplicación de MSCs en la retina y nervio óptico, así como su relación con las respuestas inmune e inflamatoria."

- **CAPÍTULO 1: "Diseñar y estandarizar un modelo experimental con signos tempranos de HO en conejos Nueva Zelanda."**

ANEXO 1: Revisión de la literatura científica para seleccionar el modelo animal más adecuado para la investigación

❖ INTRODUCCIÓN

Características del sistema inmune en los conejos

En los últimos años, las teorías sobre los mecanismos que regulan el desarrollo y la expresión de las respuestas inmunitarias se han basado principalmente en estudios realizados en humanos y roedores (115). Este enfoque se ha fundamentado en la suposición de que el sistema inmunológico es esencialmente similar en las diferentes especies de mamíferos y, por lo tanto, que los mecanismos de las respuestas inmunitarias son comparables. En este sentido, estudios comparativos han demostrado que la composición de los sistemas inmunitarios de varias especies es similar, pero no idéntica. Por ejemplo, se ha observado en conejos que las moléculas de clase II son expresadas en granulocitos, además de en células B y monocitos en reposo. La presencia de moléculas de clase II en células T en reposo sugiere que estas células podrían participar en respuestas inmunitarias restringidas por el HMC, algo que no se observa en humanos (329).

En los conejos, el saco vitelino está presente durante todo el embarazo y actúa como el sitio inicial de la eritropoyesis definitiva. Las células fagocíticas del sistema inmune innato, como los macrófagos y los granulocitos, están presentes en el saco vitelino en números similares a los de la médula ósea. Al nacer, existen células sanguíneas inmaduras en el hígado, y la médula ósea se convierte en el principal órgano eritropoyético, produciendo glóbulos rojos durante la primera semana después del nacimiento y alcanzando niveles circulantes de adulto a las tres semanas (329,330).

En cuanto al linaje de las células B, las células pre-B tempranas en la médula ósea constituyen la mayoría de las células B al nacer. A las 16 semanas, casi no se encuentran células pre-B en la médula ósea, y la mayoría de las células del linaje B son ya maduras (331). En circulación, el número

de células B aumenta del 25% en las primeras dos semanas de vida al 44% en la semana 18 (332). Respecto a las células T, en los conejos la médula ósea contiene un 10% de linfocitos T durante las primeras tres semanas después del nacimiento, manteniéndose en torno al 15% hasta la semana 6. Los linfocitos T representan aproximadamente el 60% de las células en la sangre durante las primeras tres semanas postnatales, disminuyendo ligeramente al 40% en la semana 18. En contraste, los monocitos sanguíneos aumentan rápidamente durante la primera semana de vida y se mantienen estables a partir de entonces (329,332). Los glóbulos blancos continúan aumentando en la circulación después del nacimiento, alcanzando niveles de adultos aproximadamente a los seis meses (329,333).

El timo en los conejos presenta estructuras y funciones similares a las de los humanos (101,329). Está compuesto por corteza, médula y corpúsculos de Hassall, estructuras tímicas responsables de la secreción de citoquinas y quimiocinas. Este órgano es fundamental para la maduración y selección de diversas subpoblaciones de linfocitos T (329) y se considera un verdadero órgano linfoide, el único durante esta etapa de desarrollo (334). En cuanto a los mecanismos de regulación mediados por citoquinas, estudios de citometría de flujo han mostrado que el patrón de expresión en leucocitos también se conserva al comparar los patrones de expresión en humanos. Esto incluye: $CD2^+$, $CD3^+$, $CD4^+$, $CD5^+$, $CD6^+$, $CD8^+$, CD11a, CD11b, CD11c, CD18, CD14, CD44, CD45, CD45R, CD45R0 y CD58. El CD4+ se expresa de manera uniforme en células Th en todas las especies de mamíferos (115,330).

El bazo de los conejos, aunque poco desarrollado al nacer, presenta células reticulares, células mieloides y focos de glóbulos rojos en desarrollo (334) con características análogas a las de los humanos (101,329). En cuanto a la expresión de citoquinas en esta especie, se han realizado estudios utilizando una amplia variedad de citoquinas, como IL-1β, IL-6, IL-8, TGF-β1 y TNF-α en el humor acuoso y vítreo, para evaluar cambios significativos relacionados con la inflamación ocular (335–338). Los ganglios linfáticos de los conejos generalmente se desarrollan al mismo tiempo que los linfocitos, que comienzan a aparecer entre las semanas 18 y 19 de gestación. Entre las semanas 24 y 27, se observa una actividad eritropoyética y granulocítica transitoria. Los eritrocitos en desarrollo se forman en áreas localizadas del estroma de la corteza rudimentaria y la médula, mientras que en los senos medulares se observan eritrocitos y normoblastos maduros (339). Las células T y B están presentes en la corteza (329,339).

Otra similitud entre los conejos y los humanos es la presencia de tejido linfoide asociado al intestino (GALT) y tejido linfoide asociado a mucosa (MALT). En los conejos, el GALT es el tejido

linfoide primario para la expansión de los linfocitos B, y su desarrollo generalmente comienza al nacer, impulsado por la microflora intestinal (340). El GALT contiene más del 60% de los linfocitos del organismo, la mayoría de los cuales son células $TCD4^+$ de memoria efectora (101). Los linfocitos se encuentran libres entre las células epiteliales y en forma agregada en los MALT, como amígdalas, glándulas salivales y placas de Peyer. Los macrófagos aparecen en las amígdalas en la semana 23 de gestación en los conejos (329). En el apéndice de los conejos, no es posible encontrar regiones foliculares organizadas de células B y T, tampoco linfocitos $TCD4^+$ o $TCD8^+$ al nacer (341). Además de funcionar inmunológicamente a lo largo de la vida, su actividad disminuye gradualmente a partir de la edad adulta (329). La inmunidad celular, medida por el rechazo de aloinjerto y las respuestas de hipersensibilidad de tipo retardado en los conejos, está presente desde el período postnatal (329,342). Tanto el sistema inmune innato cuanto el sistema inmune adaptativo están presentes en esta especie (104). Sin embargo, existe una diferencia en el tiempo de desarrollo del sistema inmunológico, que es relativamente similar entre los mamíferos. El sistema inmunitario de los conejos requiere períodos más largos para alcanzar un estado de madurez comparable al del humano al nacer. No obstante, estos animales pueden utilizarse como modelos relevantes para comparar los efectos del sistema inmunitario con los de los humanos (329).

- **El conejo como modelo de enfermedad ocular**

La utilización de modelos experimentales basados en animales permite investigar los mecanismos de producción del glaucoma a niveles tanto moleculares como celulares. El paciente con diagnóstico de glaucoma presenta un daño ocular preexistente, lo que dificulta el estudio del desarrollo de la enfermedad desde su inicio mediante el diagnóstico *in vivo*. Por ello, es importante emplear modelos animales para estudiar la fisiopatología de la enfermedad (343). Sin embargo, debido a la complejidad del glaucoma, un solo modelo animal nunca logrará replicar con precisión todos los aspectos de los diferentes tipos de glaucoma humano (344). Se han descrito varios tipos de modelos experimentales de glaucoma, como cultivos celulares, ojos *post mortem* y modelos animales. Los modelos animales mantienen intactos el sistema visual y el organismo del animal, por lo que las respuestas fisiológicas son más similares a las que ocurren en pacientes con glaucoma que las observadas en cultivos de células u órganos. No obstante, estos modelos experimentales presentan limitaciones, como la falta de cooperación de los animales y la necesidad de anestesiarlos para realizar los procedimientos (345), lo que puede afectar los resultados y representar un riesgo para los animales (346).

Los modelos animales utilizados en la investigación del glaucoma deben tipificar la enfermedad con alta precisión. Por ello, los modelos preclínicos experimentales deben replicar algunas de las siguientes lesiones: daño de los axones de las CGRs; alteraciones en el segmento anterior; muerte de CGRs; alteración inducida por HO; así como alteraciones en el nervio óptico (347), además de presentarse prácticos y rentables (348). La mayoría de los estudios preclínicos en el campo del glaucoma se han realizado en roedores. Sin embargo, actualmente se están desarrollando modelos en diversas especies animales, incluyendo monos, conejos, ratones, cerdos y perros (349,350). No obstante, el uso de estos animales puede presentar problemas éticos. Estas restricciones buscan garantizar el bienestar de los animales y una evaluación ética que considere los costos y beneficios específicos para cada especie (351). Dado que estas son investigaciones *in vivo*, los investigadores están obligados a aplicar el principio de las tres R descritas por Russell y Burch, a fin de minimizar el sufrimiento o el daño a los animales. Las Tres R son: Reducir la cantidad de animales utilizados; Reemplazar el animal vivo con técnicas experimentales alternativas y Refinar las técnicas para minimizar el sufrimiento animal. Estos principios han sido adoptados a través de estándares bioéticos aplicados por los comités de ética de diferentes países del mundo (352).

Al diseñar estudios de glaucoma, el modelo utilizado debe proporcionar la mínima gravedad y duración necesarias de la enfermedad para responder a la pregunta científica o probar la hipótesis planteada. Factores como el sexo, la edad, la anestesia utilizada, el procedimiento quirúrgico y el entorno también pueden afectar el resultado (343). La elección de la especie ideal para la investigación depende de factores como la similitud de las estructuras oculares con el ojo humano, la disponibilidad, el costo, la facilidad de manipulación y el conocimiento de las estructuras y funciones de la retina de la especie a utilizar (353). En términos de similitud anatómica con el ojo humano, el mono sería el modelo ideal para el estudio del glaucoma. Sin embargo, el alto costo y la difícil obtención de estos animales hacen inviable su uso. Actualmente, los principales modelos animales utilizados para desarrollar glaucoma son ratones y conejos, ya que son especies de fácil manipulación y bajo costo (354). No obstante, existen algunas diferencias que deben considerarse entre el ojo del conejo y el ojo humano.

Algunas estructuras oculares del conejo, como la cabeza del nervio óptico, el tejido conectivo, los astrocitos (355), y la composición del humor acuoso con aminoácidos y péptidos libres, presentan características similares a las observadas en seres humanos con glaucoma (356). Por lo tanto, el ojo de conejo es un excelente modelo tanto para el análisis de la composición bioquímica ocular como para la inducción de hipertensión. Por otro lado, estos animales tienen un grosor

escleral menor, mayor flujo coroideo y un volumen vítreo aproximadamente 1.5 mL menor en comparación con los humanos, lo que puede dificultar la producción de algunos modelos de glaucoma y la evaluación del efecto terapéutico en la retina (357). Aunque el tamaño del ojo de conejo es generalmente más pequeño que el de un humano, las dimensiones de la cámara anterior facilitan el acceso al segmento anterior, lo que permite el uso de algunas técnicas oftalmológicas. El cristalino de los conejos suele ser más grande y más grueso, ocupando más espacio en la cavidad vítrea (ver figura 40) (358), lo que podría complicar la recolección de muestras del segmento posterior para análisis bioquímico.

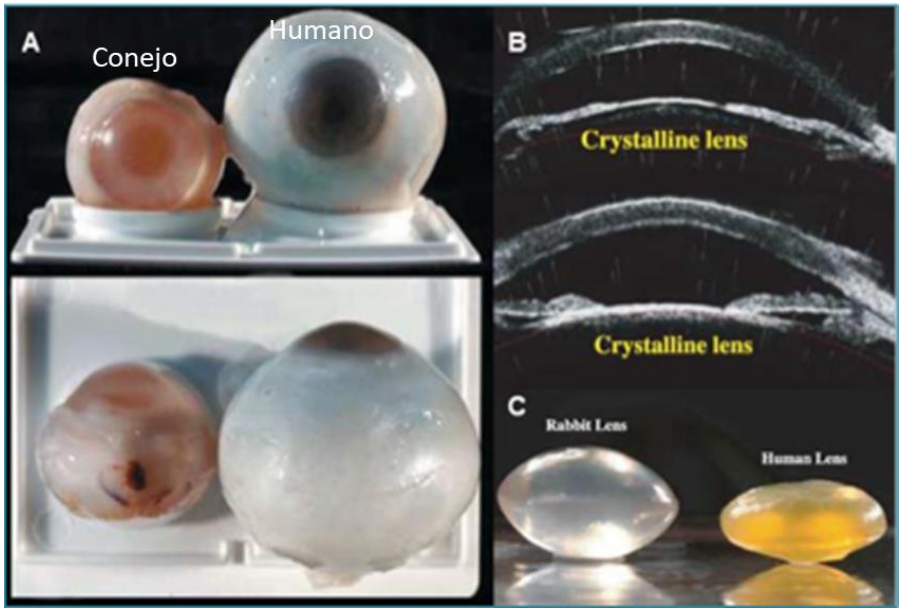


Figura 40: Imágenes comparativas del ojo de conejo y del ser humano. **A)** Globo ocular de conejo (izquierda) y de humano (derecha); **B)** Imagen ecográfica que muestra como la cámara anterior del conejo (arriba) es menos profunda que la del ser humano (abajo); **C)** Cristalino de conejo (izquierdo) de mayor tamaño que el del ser humano (derecho). **Fuente:** *Modificado* de (358)

La retina de los conejos posee una depresión natural en su disco óptico y carece de arterias centrales en la retina. Estos animales presentan una retina de tipo merangiótica con una banda horizontal de fibras mielinizadas. En los animales albinos, el epitelio pigmentado de la retina no produce pigmentación, lo que facilita la evaluación de los posibles efectos tóxicos de los fármacos, ya que generalmente el pigmento ocular desempeña un papel protector contra la toxicidad (355). Además, la respuesta al daño en el nervio óptico en conejos presenta características clínicas y experimentales similares a las observadas en humanos con glaucoma (356). Una importante diferencia en la realización del PEV en humanos y en animales es que en estos últimos es necesario el uso de anestésicos, que pueden afectar la neurotransmisión y, en consecuencia, el PEV (359,360).

Por esta razón, es fundamental utilizar el mismo protocolo de anestesia en todos los estudios para obtener resultados comparables y reproducibles. Otros factores relevantes en el uso de conejos como modelo experimental son la edad y la temperatura corporal. Los conejos jóvenes, menores de tres meses, presentan una amplitud de onda b más pequeña que los conejos de mayor edad (15 a 27 meses) (361). Si la temperatura del animal disminuye demasiado, puede reducirse el metabolismo general, lo que a su vez altera las medidas electrofisiológicas en ratas y conejos (362,363).

Entre las similitudes fenotípicas encontradas entre conejos y pacientes humanos con glaucoma, destacan la edad de inicio, la elevación de la PIO y la buftalmia (356). Los conejos de la raza Nueva Zelanda tienden a desarrollar glaucoma congénito espontáneo. En estos casos, la disgenesia del ángulo de la cámara anterior en el conejo parece ser secundaria a una alteración en la diferenciación y el mantenimiento de la integridad estructural de la MT. Algunos de estos cambios se asemejan a los observados en pacientes con glaucoma (364). Muchos estudios han indicado que el glaucoma en conejos tiene un patrón autosómico recesivo con penetrancia incompleta (semi letal) (364). Normalmente, se manifiesta en los primeros seis meses de vida y se asocia con una elevación variable de la PIO, córneas agrandadas edematosas y buftalmia. La disminución del flujo de drenaje, que se correlaciona con los hallazgos histológicos en la MT, además de la pérdida de CGRs y la excavación del nervio óptico, son características observables en conejos con esta enfermedad (317).

Artículo I.

medicina

MDPI

Review

Experimental Models of Glaucoma: A Powerful Translational Tool for the Future Development of New Therapies for Glaucoma in Humans—A Review of the Literature

Karine Evangelho [1], Claudio A. Mastronardi [2,†] and Alejandra de-la-Torre [2,†,*]

[1] Doctorado en Ciencias Biomédicas y Biológicas, Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas, Universidad del Rosario, Bogotá 11121, Colombia; evangelho.karine@gmail.com
[2] Neuroscience Research Group (NeurUROS), Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad del Rosario, Bogotá 11121, Colombia; mastronardic@hotmail.com
* Correspondence: alejadelatorre@yahoo.com
† These authors contributed equally to this work.

Received: 22 January 2019; Accepted: 4 June 2019; Published: 17 June 2019

check for updates

Abstract: Glaucoma is a common complex disease that leads to irreversible blindness worldwide. Even though preclinical studies showed that lowering intraocular pressure (IOP) could prevent retinal ganglion cells loss, clinical evidence suggests that lessening IOP does not prevent glaucoma progression in all patients. Glaucoma is also becoming more prevalent in the elderly population, showing that age is a recognized major risk factor. Indeed, recent findings suggest that age-related tissue alterations contribute to the development of glaucoma and have encouraged exploration for new treatment approaches. In this review, we provide information on the most frequently used experimental models of glaucoma and describe their advantages and limitations. Additionally, we describe diverse animal models of glaucoma that can be potentially used in translational medicine and aid an efficient shift to the clinic. Experimental animal models have helped to understand the mechanisms of formation and evacuation of aqueous humor, and the maintenance of homeostasis of intra-ocular pressure. However, the transfer of pre-clinical results obtained from animal studies into clinical trials may be difficult since the type of study does not only depend on the type of therapy to be performed, but also on a series of factors observed both in the experimental period and the period of transfer to clinical application. Conclusions: Knowing the exact characteristics of each glaucoma experimental model could help to diminish inconveniences related to the process of the translation of results into clinical application in humans.

Keywords: glaucoma; experimental models; therapy; animals; aging; translational ophthalmology

1. Introduction

Glaucoma is a leading cause of irreversible blindness worldwide [1]. The data suggests an increase in the incidence of this pathological condition by 2020, with this disease affecting more than 80 million people, 8.4 million of whom are expected to develop blindness [2]. At present, visual impairment and blindness represent a major burden on healthcare systems. For instance, it has been estimated that major visual disorders among individuals aged 40 years or older cost the US $35.4 billion a year [3].

Glaucoma is a neuropathy characterized by a progressive loss of retinal ganglion cells (RGC), their axons, and a concomitant loss of the visual field. Therefore, most pre-clinical glaucoma models are designed to increase intraocular pressure (IOP) to levels that produce a deterioration of the RGC without causing damage to the rest of the intraocular structures [4]. However, some patients develop

normal tension glaucoma, which is not associated with an increase in IOP [5], demonstrating that several mechanisms independent of pressure are responsible for the development and progression of glaucomatous neuropathy [6]. When patients are diagnosed with glaucoma, they already have pre-existing ocular damage; this makes it difficult to study the development of the disease from its starting point only with the diagnosis in vivo. This is one of the reasons why animal models are used to study the pathophysiology of glaucoma [6]. However, given this complexity, a single animal model will never precisely model all aspects of all the different types of human glaucoma [7].

Glaucoma can be classified as primary and secondary and in relation to the angle (closed or open) [7] and experimental models have already been developed for both forms of presentation. The most common form is primary open angle glaucoma (POAG), yet the prevalence of distinct types of glaucoma differs for each particular region of the world [5]. In glaucoma, the level of IOP constitutes a major risk factor. Preclinical studies showed that lowering IOP can often prevent RGC loss, but clinical evidence suggests that lessening IOP does not prevent glaucoma progression in all patients. There are other risk factors—such as old age, family history of glaucoma, race, and use of systemic or topical corticosteroids—that are also consistent with the presence of glaucoma. Despite the existence of these risk factors, the reduction of IOP, usually with ocular hypotensive drops, remains the only proven method to treat the disease. For this reason, studies based on experimental models with animals have helped to understand the mechanisms of formation and evacuation of aqueous humor, as well as the maintenance of the homeostasis of IOP. These studies have contributed to the understanding of glaucoma's etiology and the therapeutic development [6].

Several types of experimental models of glaucoma have been described, such as cell cultures, postmortem eyes, and animal models. All have advantages and disadvantages. The animal models keep the visual system and the animal's organism intact; therefore, the physiological responses are more similar to those that occur in patients with glaucoma than those observed in the cultures of cells or organs. However, these experimental models are limited by the lack of cooperation of the animals and the need to anesthetize them to perform the procedures [8], which affects the results and represents a risk for the animals themselves.

Given these challenges, there is a need to develop new preclinical animal models to mimic human glaucoma and to try new therapeutic strategies in a more reliable way. When designing glaucoma studies, the model used should provide the minimum severity and duration of the disease necessary to answer the scientific question under investigation or the hypothesis being tested. In addition, factors, such as sex, age, anesthesia used, surgical procedure, and the environment, also affect the outcome, which implies that changing the environment to improve well-being will have an impact on the outcome. This review provides information regarding the choice of the ideal animal research model for the induction of glaucoma, in order to transfer knowledge to human practice. It offers a summary of current preclinical models, describing their advantages and limitations.

2. Glaucoma and Aging

Glaucoma is a product of multiple phenomena, involving genetic and environmental risk factors. Cellular aging occurs by the lifelong accumulation of oxidative damage, leading to possible neuronal apoptosis and to the functional deficits of aging, causing the loss of visual function in older adults [9].

Quantitative and qualitative changes occur in collagen structures and cause alterations in the extracellular matrix, generating a more rigid extracellular environment at the ocular level, according to the individual ages [10]. Increased collagen production can provide stiffness in the aged tissue by making it weak and decreasing the elasticity compared to younger tissue [11], with ocular rigidity increasing with age [12]. One of the problems caused by ocular stiffness is the increase in IOP, caused by the decrease in the drainage flow of the aqueous humor [13]. In glaucoma, the main structures affected by changes in the extracellular matrix are the trabecular meshwork and the head of the optic nerve. These structures present more rigidity and greater fibrotic change due to the extensive remodeling of the extracellular matrix [14]. The amount of insults tolerated by the retina produces a "sliding

window" effect in the age of onset of glaucoma, increasing the prevalence of this disease in individuals of 40 years [15]. Interestingly, research reports that increasing age is a major risk factor for glaucoma, although several studies show no significant change in IOP with age [15]. It is already reported in the literature that people who suffer from diseases, such as hypertension, and elevated intraocular pressure associated with the age factor are more at risk of developing POAG [16]. Most of the research done in animal models to produce glaucoma used young animals. This factor can alter the results of the study, hindering the understanding of the disease and its transfer to the clinic, since the risk factor of the disease is directly related to the increase in the age of the patients [14]. There are very few experimental studies in the literature comparing the results of glaucoma induction in middle-aged and older animals, and these tend to report inconsistent results. However, when using animals of different ages, we should have some specific care, such as: Weight loss (caused by teeth that are too large, which affects their ability to eat), environmental acclimatization, and animal management (related to stress), as well as the use of anesthetic agents (older animals are more at risk).

The age-dependent ocular hypertensive response to topical steroids has been observed in experimental model rabbits with good resemblance to clinical observations in humans. Topical application of dexamethasone resulted in an increase of intraocular pressure of young rabbits (5 mmHg or more IOP rise in 76%) but had no effect on the intraocular pressure of old rabbits [17,18]. In young rabbits, it is possible to observe alterations in the outflow of aqueous humor due to the immaturity of the iridocorneal angle, these particularities are also observed in young patients. In addition to this particularities in young rabbits, these animals have a greater capacity to respond to steroids which may be due to the increased permeability of the cornea [19].

Chronic glaucoma models developed in mice can also show age-dependent structural changes, such as the progressive thinning of the outer plexiform layer, the decrease in the amplitude of the a and b waves of the electroretinography (ERG) in adult animals, and progressive degenerative structural changes [20]. The extent to which the retina ages generates less ATP, and the ERG tracing may decrease, as observed in the retina of young mice compared to old mice [16]. It is possible to observe a decrease in some layers of the retina in old mice compared to young mice. Also, it is possible to observe that the crushing of the optic nerve occurs more rapidly in older mice than in young mice [21]. For example, there are reports of RGC degeneration that begins quickly following mechanical optic nerve damage. After a severe crush injury in the mouse, RGC survival has been shown to drop to 47% and 27% at one and two weeks post-injury [4]. These characteristics indicate that age affects both the retinal lesion and recovery [14], helping to select the animal model for study.

3. Diagnostic Refinement in Humans

Anatomical and functional changes produced by glaucoma are often irreversible. Therefore, early detection remains an important strategy to prevent vision loss. Consequently, the evaluations of the structure and function of the ON and lamina cribrosa (LC), as well as detection of alterations in RGC, remain the best methods for disease prevention [22]. Currently, the main evaluation tools used and tested in practice are tonometry for the measure of the IOP and the visual field test to evaluate the progression of visual field defects [22]. Nowadays, it is common to use ERG, oscillatory potentials [23], and optical coherence tomography (OCT) as methods of early diagnosis of glaucoma [22]. These diagnostic methods are easy to perform and minimally invasive, making it possible to utilize them in animal models [23].

4. Models Used for the Understanding of Pathophysiology of Glaucoma

Over recent decades, studies conducted in animal models have contributed to the understanding of the functionality of various clinical and surgical therapies for glaucoma [24]. A wide range of treatment strategies aiming to aid the preservation of visual function has been tested, and yet, until now, there has been little progress in launching new classes of drugs against glaucoma. This lack of innovation has caused a significant revenue decrease in the glaucoma pharmaceutical market.

However, some drugs in the experimental phase are in the process of entering the ophthalmology market [25].

Currently, attempts are being made to increase the productivity of drug development through genetic manipulation strategies in human tissues and cells. The use of stem or progenitor cells for cell replacement is a promising strategy due to the demonstrated ability of these cells to induce tissue reconstruction and functional regeneration [26]. However, the absence of predictive animal models limits the opportunities available to study glaucoma and estimate the success or failure of new therapies during clinical trials [25].

Animal models used in glaucoma research should typify the disease with high precision. Due to this, experimental pre-clinical models have to replicate some of the following lesions: Damage of the RGC axons; alterations in the anterior segment; death of RGC; OH induced alteration; as well as alterations in the head of the ON and in the LC [27], and to do so while being practical and cost-effective [28]. The vast majority of pre-clinical studies in the field of glaucoma have been conducted in rodents. Nevertheless, a variety of models are currently being developed in different animal species, including monkeys, rabbits, mice, pigs, and dogs [29,30], all of which have their advantages and limitations (Table 1). Meanwhile, the use of these animals can present problems of ethical restrictions. These restrictions aim to ensure the animal's welfare as an ethical assessment of a consequentialist nature, evaluating the costs and benefits specific for each species [31]. Because they are in vivo investigations, researchers are obliged to apply the principle of the three R's described by Russell and Burch [31], in order to minimize suffering or harm for the animals. The three Rs are: Reduce the number of animals used; replace the living animal with alternative experimental techniques; and refine the techniques to minimize animal suffering. These principles have been adopted through bioethical standards enforced by the ethics committees of different countries around the world [4].

4.1. Non-Human Primates

Due to anatomic similarities of the iridocorneal angle, retina, and optic nerve head, non-human primates serve as the animal model of choice for glaucoma research [32]. However, the mere fact of anatomical similarity between species is insufficient for it to become an ideal experimental model, as there are potential complications that can occur during the translation of pre-clinical results to human subjects. The complications may involve inadequacy in the course of the disease produced in animals and humans, and a mismatch between visual loss developed in a clinical trial and the one studied in the preclinical model due to the reduced research time in these animals [24]. In this animal model, it is possible to evaluate RGC, as well as to validate non-invasive tests for the onset and chronicity of glaucoma through in vivo measurements of neural structure and function [33]. Moreover, it also serves as an excellent model of ON excavation [34]. With respect to the anatomical resemblance between primate and human eyes, various similitudes have been described, including the anterior part of the trabecular meshwork (TM), the presence of collagen fibers developed in the LC, and a flat disk, as well as the morphology of the ON and the number of RGC [35]. Other characteristics of this model, that are close to humans, are the long lasting IOP elevation and the physiologic processes of the monkey eye [32]. The main anatomical difference between the human and monkey eye is the large number of septa in the Schlemm's Canal [28]. Overall, a non-human primate model of glaucoma provides several advantages, such as a greater opportunity for studying central effects of the disease, including responses in the central nervous system (CNS) visual centers [24]. However, the use of these animals presents some disadvantages, such as a low availability of the genomic sequence and inaccessibility of transgenic strains as well as rising ethical concerns, high cost, and the need for special facilities alongside the difficulty of both maintenance and handling [28]. All these factors ultimately lead to these animals being used less frequently [24].

Table 1. Advantages and limitations of different animal models of glaucoma.

Animals	Induction of Glaucoma	Advantages of the Model	Limitations of the Model
Monkey	Laser photocoagulation Intracameral injection of microspheres	Anatomical similarity with the human eye Similarity in AH dynamics Excavation of ON Experimental elevation of IOP	Genomic sequence Transgenic strains availability High cost Simplicity of maintenance and handling Ease to develop experiments
Rat/Mouse	Injection of hypertonic saline rat into episcleral veins Cauterization of episcleral veins Laser photocoagulation Reperfusion ischemia HA Intracameral injection Intracameral injection of microspheres Genetic	Similarity in AH dynamics Excavation of ON Experimental elevation of IOP Simplicity of maintenance and handling Ease to develop experiments Low cost	Spontaneous elevation of IOP Genomic sequence
Rabbit	Topical application corticoids Laser photocoagulation HA Intracameral injection	Ease to develop experiments Anatomical similarity with the human eye Similarity in AH dynamics Spontaneous elevation of IOP Simplicity of maintenance and handling Low cost	Genomic sequence Transgenic strains availability
Pig/Mini pig	Cauterization of episcleral veins Laser photocoagulation	Similarity in AH dynamics Excavation of ON Experimental elevation of IOP Simplicity of maintenance and handling Low cost	Ease to develop experiments Genomic sequence Transgenic strains availability
Zebrafish	Genetic	Genomic sequence Transgenic strains availability Anatomical similarity with the human eye Spontaneous elevation of IOP Low cost	Ease to develop experiments
Dogs	Genetic	Excavation of ON Experimental elevation of IOP	Ease to develop experiments

4.2. Rabbits

Some of the eye structures of rabbits, such as the ON, LC, and astrocytes [36], as well as the composition of the aqueous humor with amino acids and free peptides are very similar to those of humans [37]. Thus, the rabbit eye serves as an excellent model for the analysis of ocular biochemical composition. On the other hand, these animals have a smaller scleral thickness, greater choroidal flow, and a lower vitreous volume of approximately 1.5 mL less compared to humans, which may hinder the production of some glaucoma models and the evaluation of the therapeutic effect on the retina [38]. Although the size of the rabbit eye is generally smaller than that of a human, the dimensions of the anterior chamber (AC) are generally larger than those of people, facilitating the use of ophthalmological techniques in the anterior segment. The lens of rabbits is usually larger and thicker, occupying more space of the vitreous cavity [39], which could complicate the collection of the posterior segment for biochemical analysis. However, this particularity of the lens can lead to increased safety of a transfer of the experimental technique to human subjects. In albino animals, the pigmented epithelium of the retina does not produce pigmentation, which facilitates the evaluation of possible toxic effects of

drugs, since generally ocular pigment plays a protective role against toxicity [36]. It is also observed that the response to ON damage presents both clinical and experimental characteristics similar to those of humans with glaucoma [37]. This animal model represents a simple, low-cost, repeatable, and reproducible alternative for pre-clinical eye disease research [18]. Rabbits are docile, have an appropriate eye size for the use of certain techniques [40], and have a relatively long life span in comparison to other animal species [18].

4.3. Rodents

Because of the powerful genetic tools available for use in laboratory mice, they have proven to be a highly useful mammalian system for studying the pathophysiology of human disease. The similarity between human and mouse eyes coupled with the ability to use a combination of advanced cell biological and genetic tools in mice have led to a large increase in the number of studies that use murine models of specific glaucoma phenotypes [27].

Currently, possible causal variants identified in human genetic studies can be validated in mice, allowing reporting on new genes and pathways that impact glaucoma [41] and improving the outcomes of translational studies. Furthermore, over the past few years, experiments in human and mouse cells revealed that some transcription factors may be equally potent in cell reprogramming [42,43]. These experimental findings have made stem cell technology increasingly accessible to laboratories without previous experience with stem cells and are now so optimized that derivation, maintenance, and cell differentiation are a widely used tool for biomedical research [43]. Increasing numbers of studies on stem cells are being carried out due to their curative potential and prospects for becoming an alternative to conventional drugs [44]. With the development of CRISPR-Cas9 technology, any limitations to the full potential of genome editing are being eliminated. Hence, it is becoming possible to edit altered genes in pluripotent stem cells of patients with certain diseases to neutralize the mutation [43,45]. This technology is being used in mice, and its application for glaucoma research promises to be informative [45].

There is extensive data on the biology of the central nervous system of rodents and how damage at the retinal and ON level is related to increases in IOP. This animal model allows for the study of the effects of the ON lesion independently of ischemia in the RGC population, owing to the presence of the central artery of the retina that can be cut without compromising retinal circulation in rodents [7]. The ocular anterior segment of rodents is examined in studies dealing with relevant aspects of the physiology of glaucoma, since these animals present similar regulatory mechanisms of the production and flow of aqueous humor to humans, and respond alike to IOP-reducing drugs [46]. Despite being presented as an optimal animal model for the induction of glaucoma, the size of the eye and the handling of these animals can deter the use of tonometry and some surgical techniques [36]. Likewise, morphological features of the optic nerve head (ONH) and TM can limit the use of these animals in the OH model. The ONH does not have collagen fiber and instead contains pores created by astrocytes [47], while the TM may not generate high flow resistance since it only has a few layers of cells [28]. The short life span of these animals is another issue that restricts the demonstration of disease progression [24] and hence compromises the translation of research data to clinical trials in patients.

The use of both rats and mice has the same advantages: They both have a general similarity with the human eye, a similarity in the dynamics of aqueous humor, experimental elevation of the IOP, and excavation of the ON. While mice have better responses in comparison to rats in relation to the spontaneous increase of IOP, the availability of the genomic sequence, and transgenic strains, it is more problematic to develop tests for mice than for rats [8]. As mice lack a collagenous LC, this animal is not recommended for research on specific functions of this structure. In rats, the RGC layer hosts a small population of displaced amacrine and horizontal cells [48], which means the anatomical criteria are based on the size of the neuronal soma, thus providing less reliable results for the transfer of research data to the clinic [7].

Despite these disadvantages, rodents remain the most commonly used animal model for research on glaucoma. Among the reasons why, is the high degree of conservation between human and rodent genomes, the availability of an established technique for genetic manipulation, and the convenience of breeding. Due to the low cost and relative ease of obtaining eyes, experimental samples in this model can be large [37].

4.4. Glaucoma Models in Other Animals

Nowadays, unconventional animals, such as pigs, mini-pigs, and zebrafish, are being used for modelling glaucomatous disease, as these animals are more accessible and their use in research raises fewer ethical concerns [29].

The pig's and mini-pig's retina have more similarities with the human [49] than the retina of any other mammal, such as the dog, cat, goat, and cow [29]. The mini-pig model of glaucoma presents a typical alteration in the ON, with a predominant involvement of arterioles serving as a study tool for this structure. However, this model offers a challenging visualization of the LC due to the central venous ring location in the center of the optic disk [50]. Regarding the ocular anatomy of pigs, their retina appears to be very similar to humans with the presence of holangiotic retinal vasculature, without tapetum, with cone photoreceptors located in the external retina, a similar scleral thickness [51], and the presence of three types of RGC. These characteristics help to elucidate the mechanisms involved in the selective death of RGC that are believed to be vulnerable in clinical and experimental glaucoma [52]. In addition, this model is capable of producing IOP elevation and is crucial for research on ocular regeneration using stem cells [53]. These animals are considered easy to handle, grow slowly, and have a suitable eye size for the use of diagnostic tools, such as OCT, corneal topography imaging, or ERG [29,54].

Although there are some differences in the ocular anatomy between zebrafish and humans, it is possible to reproduce chronic IOP elevation, loss of RGC, and progressive damage in the ON in these animals [55]. The eye anatomy of zebrafish has some similarities to the human ocular structure. Similitudes include the retina, ON as well as the development of a superficial ectoderm, neuroectoderm, and mesenchyme of the head; however, the lens is rounder than in humans [56]. Zebrafish behavior is an invaluable tool for analyzing visual function. Zebrafish alter their skin pigmentation when exposed to different light intensities by expanding or contracting melanosomes; if a fish has impaired vision, it perceives itself to be in an environment with low light intensity, therefore appearing hyper-pigmented [55]. Insertional mutagenesis is a powerful tool for the search and determination of the function of genes involved in the development of vertebrate organisms [57] and in disease progression, for instance, in glaucoma [58]. The mapping and characterization of many genes important in maintaining normal eye development in the zebrafish have also been identified through reverse genetic or genotype-based analysis [59]. Germline transgenic fish can be generated in order to evaluate the role of the over-expression and misexpression of candidate disease genes. However, the application of antisense modified oligonucleotides, known as morpholinos, is most often used to inhibit specific gene functions [60]. For example, while there is just one *PAX2* gene in humans, there are two coding genes in zebrafish: *Pax2.1* and *pax2.2*. Careful study of duplicated genes has led to the general observation that most often, the two duplicated genes diverge over time within regulatory sequences [58]. The hypothesize that the mutated LMX1B may act in concert with another inherited mutation to promote glaucoma in more subtle ways due to a small elevation in IOP and a secondary mutation may predispose ganglion cells to be more sensitive to elevated IOP [58]. The zebrafish is an ideal model to carry out ambitious projects with moderate budgets [61] due to its short production time, large number of offspring, and easy handling [56]. One of the limitations that makes translational research rather challenging [24] in this animal model is its small size, since the anterior segment of the eye has an average diameter of 1.4 mm and a maximum average depth of 0.25 mm in the peripheral angle, thus it is difficult to use diagnostic methods, such as OCT, tonometry, and ERG [58].

5. Diagnostic Refinement in Animals

When choosing an animal model for studies involving particular tests, the researcher should be especially cognizant of the differences in the performance of the procedure between pre-clinical study and applications in humans, as in the case of ERG [62,63]. The use of anesthetics to perform ERG in animals is known to affect neurotransmission, consequently altering test results [64]. Other relevant parameters are body temperature and age. A significant decrease in the animal's body temperature leads to an overall decline in metabolism, diminishing the intensity of chemical reactions and the amplitude of ERG in rats and rabbits [65]. Age, on the other hand, can also interfere with the test results; for instance, young rabbits of less than 3 months of age exhibit smaller b-wave amplitudes than older rabbits aged 15 to 27 months [66]. Thus, age is an important data consideration when transferring experimental results to clinical studies in humans.

The IOP values vary by animal breed, method of sedation, and measure. In general, excessive restraint, inadequate positioning, or lack of experience in the use of equipment can increase IOP [29]. This information is very important when reviewing preclinical results of drugs that reduce IOP and during translation to clinical trials in humans, since the reduction in IOP may occur due to the employed technique and not due to the studied drug [67]. When measuring IOP in rabbits, one must be extremely cautious while standardizing the results, since stress can provoke eye dryness, thus altering the measurements [68]. Some other variables, such as blood pressure, pulse, respiration, and anxiety, may also affect IOP measurement, modifying the reliability of results [67,69].

6. Genetic Models of Glaucoma

The main advantage of working with genetically modified animals compared to surgically induced models is a more uniform response in terms of the elevation of IOP, and damage to the retina and ON. Importantly, the use of modified animals significantly aids the identification of interactions between loci that cause complex disease [59]. However, the time needed for these animals to develop glaucoma is usually too long (9–15 months) and cannot be adapted experimentally [4].

In current practice, animal models with certain genetic characteristics are established as inbred strains, for example, DBA/2 J mice. This strain of mice is used as an experimental model of POAG, since they develop a progressive chronic increase in IOP that causes the death of RGC [69]. The increase in IOP in these animals starts at 8 months of age, and the pressure remains high until death [29].

The use of the inbred animals, such as the same age, sex, weight, and stage of the disease, may decrease experimental variability, which would make it difficult to transfer preclinical data to a clinical trial. These conditions cannot be met in clinical trials as patients vary in age, stages of the disease, compliance with the use of therapy, and visual performance, as well as having different pharmacological profiles [24]. These particular characteristics must be taken into consideration by the researcher when choosing the aforementioned animal model for the experiment, as the results may be significantly different in animals compared to clinical research in human subjects.

Progress in the treatment of glaucoma has been linked to the development of transgenic models. One of these models exhibits a specific mutation in the gene of alpha-1 subunit of type 1 collagen linked to a gradual elevation of IOP and progressive loss of the ON axon [70]. Transgenic mice expressing this form of collagen develop IOP that is elevated by almost 5 mmHg compared to controls at 36 weeks. These mice demonstrated progressive optic nerve axon loss with normal organization of the drainage structures [4]. Mutations affecting serine protease (PRSS56) produce a certain type of phenotype in mice that is similar to angle-closure glaucoma with a reduction of the ocular axial length, a relatively large lens, and a narrow angle [71]. In addition to these models of glaucoma, we highlight a model capable of reproducing the degree of elevation of IOP, degeneration of the peripheral optic nerve, and damage produced in the retina of humans through the formation of transgenic mice expressing the Tyr437His mutation of human myocilin protein with the purpose of producing primary open angle glaucoma [72,73]. To induce normal-tension glaucoma, mice with a deficiency in the glutamate/aspartate transporter (GLAST) are used. These animals show typical glaucomatous

damage, such as death of RGC (due to greater sensitivity to oxidative stress) and degeneration of the ON [74]. The incidence of congenital glaucoma in humans is less than 1% and is associated with a number of transcription factors, including: *FOXC1, FOXC2, PITX2, LMX1b*, and *PAX6* [4]. Targeting of NC-Foxc1 and NC-Foxc2 enables the identification of malformations in the embryonic period as the joint expression of these genes regulates early development of some ocular structures [75]. The knockouts of these genes are lethal in the embryonic or neonatal periods. Foxc1 −/− mice die at birth and Foxc1 +/− animals have defects in the ocular drainage structures without changes in the IOP [4]. Conditional knockout mice for Foxc2 are generated by the elimination of Foxc2 from cells derived from the neural crystal. These animals suffer from ocular disease [75] and are used to study the development of the ocular drainage angle. *CYP1B1* (cytochrome P450, family 1, subfamily b, polypeptide 1) is a gene suggested to be involved in congenital glaucoma. *CYP1B1* Knockout (KO) animals are capable of developing ocular abnormalities similar to those observed in humans with primary congenital glaucoma, for example, small or absent Schlemm's canal, defects in the TM, and fixation of the iris to the TM and peripheral cornea [76].

7. Models of Ocular Hypertension (OH)

Different experimental OH models have been employed in order to determine the effects of increased IOP on neuronal populations of the retina and to define the changes occurring in the external retina after the elevation of IOP [77].

Animal models of OH developed to imitate POAG show moderate increases in IOP that produce damage at the level of the ON. For this reason, reaching extremely high pressures in the induction phase of the disease should be avoided as it could alter the progressive nature of the damage [78].

Various techniques are employed to chronically elevate IOP in experimental glaucoma models in the short term and over an extended period of time under controlled conditions [4,36]. These include laser photocoagulation of the TM, injection of hypertonic saline into episcleral veins [79], cauterization of the episcleral veins, and the injection of substances into the AC to obstruct the aqueous outlet [22]. These methods differ in pressure increase, as well as in the level of control the researcher has over these parameters [7]. As such, researchers should carefully consider which models are best for their particular experiments and the resulting data that can be applied in the clinic. It should be noted that in order to obtain an optimal result in research, it is necessary to provide the animals with adequate accommodation conditions and good acclimatization, as well as a balanced diet, the use of aseptic techniques, and control procedures with anesthetic and analgesic protocols that guarantee the welfare of the animals. In addition, the animal should be monitored constantly and humane endpoints should be determined in advance with the veterinary staff.

The laser photocoagulation technique involves damaging TM, blocking the elimination of aqueous humor, and consequently increasing IOP [4]. The monkey model with laser-induced ocular hypertension mimics clinical glaucoma in humans in respect to aqueous humor inflow and trabecular outflow, two important parameters in the control of IOP [80]. This technique requires at least three laser applications with 7-day intervals to increase IOP by 60%. Major disadvantages of this method are the production of anterior peripheral synechiae, hyphema, and corneal edema [81], as well as its high cost [65]. Modulation of the intensity, duration, and number of laser points provides some control over the duration and range of elevation of the IOP [4].

Mittag et al. comments that in order to investigate cellular processes and mechanisms of RGC death in mice with a diode laser, it is necessary to combine the damage to the TM and scleral veins, using the laser setting at a power of 0.4 W and duration of 0.7. However, if the researcher aims to study the neuroprotective effect of a novel drug, it may be beneficial to use the same power and duration setting, while making a direct application in the TM. This way the damage occurs more slowly, facilitating the detection of the effect of proposed therapy [81].

Use of the argon laser coupled with a slit lamp shows a particular feature of pigment affinity. The presence of pigment in the camera angle drastically alters the absorption of laser energy and

the extension of damage produced in the TM [82]. Some researchers have used this feature to their advantage by administering pigment particles in the AC or using pigmented rats to increase energy absorption. For example, there are reports of utilized injection of carbon particles into the anterior chamber of Wistar rats to argon laser treatment directed at the TM. The carbon particles, which by the time of the laser treatment had accumulated within the anterior chamber angle, absorbed laser energy and produced focal heat, thereby generating a localized scarring effect [83]. However, characteristics of the latter model make laser absorption high and inconstant, hence exacerbating the inflammation, which in turn results in a great variation in the subsequent elevation of IOP [4]. Therefore, this model can only be used for certain strains of rodents.

The use of laser photocoagulation combined with temporary narrowing of the iridocorneal angle by paracentesis of AC is also described in the literature. This model is capable of causing an extremely abrupt IOP increase for 3 weeks and a significant decrease in the number of RGC that does not occur during POAG in humans. Other disadvantages of this technique are the presence of inflammation or ischemia and the opacity of the central cornea [84].

A chronic increase in IOP can also be induced by means of a model in which 50 µL of hypertonic saline solution is injected into the collecting veins of a rat's eye, producing sclerosis of TM and ON damage [78]. In a study of 20 consecutive animals, only 9 had an increase in IOP following a single injection, while subsequent injections raised the intraocular pressure in 7 others. In addition, the mean sustained pressure elevations ranged from 7 to 28 mmHg and the retinal vasculature remained perfused in all eyes [78]. For this model of chronic glaucoma, it is necessary to use specialized microneedles extracted from borosilicate glass micropipettes, attached to a 1 mL syringe, to provide sufficient flow pressure at the tip of the needle. It is necessary that fluids employed in this system are not viscous. To perform this technique, a preceding lateral canthotomy and the application of a plastic ring around the eye is necessary to increase the pressure in other aqueous veins and to drive the sclerosing agent to the limbus. The microneedle should be pointing towards the limbus placed in a position parallel to the vessel wall. At the moment of injecting the solution, special attention should be paid to the coloration of the vessel, since it should remain pale [78]. It should be noted that this technique must be applied in anesthetized animals.

The model based on the application of hypertonic saline solution in the episcleral vein results in a moderate elevation of IOP within 7 to 10 days of the application, with a considerable level of variability between 0 and 30 mmHg [78]. Norwegian brown rats are used for this model due to their docile behavior, which permits daily IOP measurements without the need for general anesthesia [24]. When there is no increase in IOP after initial injection, the procedure can be repeated [54,85]. In this model, OH tends to persist for longer periods of time in comparison to laser-induced OH [86]. This model has been shown to produce progressive loss of RGC, degeneration of ON, and specific changes in ERG, making it similar to other forms of OH [85]. It is generally recommended for studies on neuroprotection [24]. The drawback of the model is that it requires highly specialized materials, injections are technically difficult to perform [87], and extensive training is required. This technique is not yet described in mice, probably due to the small size of the eye, which makes injection into the vessel more difficult [79].

The POAG model can be induced in mice and mini-pigs using the episcleral vein cauterization technique [29]. This model consists of exposing the ocular surface by retracting superior and lateral rectus muscles and applying stimulation by cautery at low temperatures directly in the episcleral veins. Causing a blockage of the drainage of aqueous humor through collecting ducts of Schlemm's canal eventually leads to a significant increase in IOP [88]. In addition to ocular venous congestion [89], an obstruction of the outflow of aqueous humor has also been described in this experimental model. For the elevation of IOP, more than two veins must be cauterized. Data from an animal study with mice indicates that cauterizing four veins brings the IOP value close to 60 mmHg [26,49]. In this model, RGC cell death due to apoptosis in the peripheral region is close to 4% weekly [4].

Another method for vein occlusion is an application of a nylon suture upon muscle retraction and ocular exposure. With this procedure, the moderate increase in pressure that is achieved immediately after surgery may last for several months. The main drawback of this technique is the possibility of blood vessel reformation with a consequent decrease in IOP that brings the need to repeat the procedure [90].

It is known that topical, periocular, and even systemic or inhaled administration of steroids can cause OH [91]. The significant elevation of the IOP can occur in a matter of hours or up to 1 day after steroid use. Drug discontinuation usually leads to normalization of IOP, however, this side effect may not be reversible in certain individuals [92]. The exact mechanism by which steroids stimulate an increase of IOP is yet to be elucidated. Nevertheless, it is known that a steroid causes stabilization in the lysosomal membrane and the accumulation of glycosaminoglycans polymerized in the TM, generating greater resistance to the outflow of aqueous humor. In addition, these drugs also increase TM resistance due to increased expression of fibronectin, elastin, and laminin [93].

Glaucoma induced by corticosteroids mimics human POAG. Unlike most experimental models of glaucoma, glaucoma generated by corticosteroids is also observed in ophthalmological practice and is generally caused iatrogenically [94]. This type of glaucoma has been mostly studied in the New Zealand breed of rabbits [39]. This animal model mimics several characteristics of the aforementioned condition in humans and provides morphological and molecular evidence on the pathogenesis of glaucomatous disease [95]. Moreover, there are many clinical, morphological, and molecular similarities between corticosteroid-induced glaucoma and POAG, which makes it an attractive model to study specific aspects of glaucomatous pathology [29].

The angle of AC plays a key role in regulating the outflow of aqueous humor and IOP. TM presents sheets containing lamellae of extracellular matrix materials, which comprise an important part of this tissue and probably of the exit flow barrier. Among the materials of the extracellular matrix of TM, some, including glycosaminoglycans (GAGs), hyaluronic acid (HA), keratan sulfate, heparan sulfate, and sulfate-chondroitin, have been identified in rabbits [96], monkeys, and humans [97].

An experimental model of POAG has been developed by application of HA in the AC in rats and rabbits. Single application of 25 µL of 1% hyaluronic acid in the AC of rats produces a significant increase in IOP that can last, on average, up to 8 days. When using the same protocol weekly, a sustained increase in IOP was observed [98]. The effect of maintaining high IOP with a single HA injection may be attributable to the fact that the AC in the rat eye is very shallow. Consequently, the intracameral concentration of the drug is higher than that achieved in rabbits [99] and also than the one expected in humans. During the performance of this technique, the needle direction requires special attention [97], since it can come into contact with the iris and cause a hemorrhage. The needle passing through the corneoscleral limbus must be beveled downward to form a greater angle with the AC and to avoid contact with the lens [99].

Rhythmic oscillations of IOP are a common feature in both humans and laboratory animals [98]. In humans, there are clinical studies reporting that the peak IOP occurs in the morning or during the night [100]. However, the IOP may present variations due to the individual's postural changes. The postural change from upright to recumbent elevates IOP, because of the hydrostatic responses in the episcleral venous pressure and the distribution of body fluid. Thus, the recumbent body position in the nocturnal/sleep period sets IOP at a different level compared with the upright body position in the diurnal/wake period [100]. Studies with intracameral injection models in rats have consistently shown an increase in nocturnal IOP, presumably due to an increase in the production rate of aqueous humor in this period [99]. Even though the mechanism of IOP elevation related to the application of viscoelastic drugs is still not clearly understood [99], it is apparent that the injection of HA in the AC produces an abnormal accumulation of glycosaminoglycans (GAGs) in the TM, complicating the drainage of aqueous humor [101].

Injection of HA in the AC provides several advantages over other experimental models of glaucoma induction: It is cheap and easy to perform, it allows high and long lasting hypertension to be

obtained, and it does not prevent the elimination of aqueous humor, which favors the conduction of pharmacological studies [100].

Another model of experimental glaucoma capable of reproducing POAG is performed in rats via the induction of reperfusion ischemia. It consists of performing paracentesis in the AC of the animal eye. IOP elevation is produced by a 30 G gauge needle connected to 0.9% saline solution at a height of 150 cm above the eye. For example, in this method, the cannulation of the anterior chamber of mice and rats with a microneedle allows one to precisely control the IOP at 110 mmHg, and blood flow through the retinal and uveal vasculature is suppressed. IOP can be normalized by reducing the pressure of the perfusion system after the ischemic exposure period is over. While this method involves extreme acute ocular hypertension, the neurodegenerative effect is thought to be mediated primarily through the ischemic insult, though it is possible that other IOP-induced damage to RGC occurs [4]. This procedure is performed for 60 min and allows an IOP of approximate 70 mmHg to be reached [102].

8. Angle—Closure Glaucoma and Neovascular Glaucoma

The experimental model for the development of angle-closure glaucoma (ACG) is described in dogs of several breeds, including beagles, cockers, and basset hounds. Beagles express the autosomal recessive phenotype and begin to develop the disease between 6 and 12 months of age. At the age of 2 to 3 years, as glaucoma progresses, the drainage angle begins to close and the excavation of the ON head can be observed [103]. Other animals are used for this glaucoma model as well, for instance, genetically modified mice. These animals have characteristics that predispose them to angle closure and high IOP, including a reduction of the ocular axial length, a relatively large lens, and a narrow angle [29].

Elevation in the levels of nitric oxide in the aqueous humor has been observed in both neovascular (NVG) and ACG types of glaucoma. This is attributed to an inflammatory manifestation of AC [88]. Therefore, substances that are used in research on these types of glaucoma shall not interfere with study outcomes, as there is a known effect of inflammation on IOP. The IOP elevation from magnetic microbeads is an experimental method that is intended to occlude TM through the use of a magnet that is directed towards the iridocorneal angle [104]. For example, the injection of 10µm latex microspheres with or without the addition of hydrox-ypropylmethylcellulose (HPM) also blocked drainage through the trabecular meshwork and increased intraocular pressure [94]. In this case, nine and six weekly repeated injections, respectively, were necessary before a sustained increase in IOP was achieved, which lasted for at least 30 weeks in each case [105]. The main advantages of this method are that the ocular fundus can be easily examined, since the microspheres do not obstruct the pupil, and that the number of injections can vary to modulate the elevation of the IOP. However, one of the limitations of this method is a fluctuating increase in IOP. The location of microspheres within the AC can also be difficult to control, compromising observations of the ON.

9. Future Research

In addition to the eye being a site of immune privilege, it also presents the blood-retina barrier, which makes it difficult for some chemical substances to enter. For this reason, neuroprotective approaches have shown great promise in both in vitro and in vivo studies [9]. The treatment can delay progression of glaucomatous optic neuropathy by lowering intraocular pressure medically or surgically [106]. New treatments targeting newly discovered neuroprotective pathways will enter clinical trials in the coming years and patients' lives will be improved by the remission or correction of disease pathologies and aging [9]. An alternative promising approach is to use stem cells as a neuroprotective effect. This therapy promotes neuroprotection and functional preservation of RGC, making it a good candidate as an adjunctive therapy to IOP-lowering medications, and thus a potential future treatment for glaucoma [107].

One of the biggest challenges of ophthalmological research in the last decade has been finding a method to replace damaged cells by a neurodegenerative process during ocular diseases without

creating unnecessary risks for patients. Soon, it will be important to ethically discuss genome editing with stem cell technology. This topic will require the participation of multidisciplinary groups of specialists in order to support scientific progress and allow for rational risk/benefit evaluations of this technology. To progress in this field, the method of implementation should foster progressive accumulation of knowledge, for which more information from studies with animals whose anatomy and physiology are relevant to humans is needed. This would permit the design of clinical trials that, in addition to being safe for both animals and patients, generate interpretable results. The information obtained with tests designed in this way will allow, in turn, rational modifications of protocols to gradually optimize their results.

10. Conclusions

Although there is no perfect experimental model, each of the existing ones has been used successfully to unravel important aspects of glaucoma pathology and could be used to develop new therapies for this disease in the future. However, glaucoma models are not exact recapitulations of the human condition. Therefore, the results obtained in pre-clinical studies should be extrapolated only to the extent that a particular model and the studied research question permits. Overall, we conclude that an ideal and reproducible glaucoma model should be easy to induce, cheap, and as similar to the glaucomatous pathology of humans as possible. Regarding the choice of animal species, the size of the animal's eye and its similarity to humans should be considered.

Author Contributions: K.E. conceived and wrote the paper. C.A.M. and A.d.-l.-T. contributed important intellectual and investigative contributions.

Funding: No funding was received for this research.

Acknowledgments: We would like to thank to Andrea Castano for revising the manuscript.

Conflicts of Interest: All authors certify that they have no affiliation with or involvement in any organization or entity with any financial interest or non-financial interest (such as personal or professional relationships, affiliations, knowledge, or beliefs) in the subject matter or materials discussed in this manuscript.

References

1. Song, P.; Wang, J.; Bucan, K.; Theodoratou, E.; Rudan, I.; Chan, K.Y. National and subnational prevalence and burden of glaucoma in China: A systematic analysis. *J. Glob. Health* **2017**, *7*, 020705. Available online: http://jogh.org/documents/issue201702/jogh-07-020705.pdf (accessed on 2 April 2018). [CrossRef] [PubMed]
2. Schmier, J.K.; Halpen, M.T.; Jones, M.L. The economic implications of glaucoma: A literature review. *Pharmacoeconomics* **2007**, *25*, 287–308. [CrossRef] [PubMed]
3. Rein, D.B.; Zhang, P.; Wirth, K.E.; Lee, P.P.; Hoerger, T.J.; McCall, N.; Klein, R.; Tielsch, J.M.; Vijan, S.; Saaddin, J. The economic burden of major adult visual disorders in the United States. *Arch. Ophthalmol.* **2006**, *124*, 1754–1760. [CrossRef] [PubMed]
4. Johnson, T.V.; Tomarev, S.I. Rodent models of glaucoma. *Brain Res. Bull.* **2010**, *81*, 349–358. [CrossRef] [PubMed]
5. Evangelho, K.; Mogilevskaya, M.; Losada-Barragan, M.; Vargas-Sanchez, J.K. Pathophysiology of primary open-angle glaucoma from a neuroinflammatory and neurotoxicity perspective: A review of the literature. *Int. Ophthalmol.* **2017**, *39*, 259–271. [CrossRef]
6. Vecino, E. Modelos animales en el estudio del glaucoma: Pasado, presente y futuro. *Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología* **2008**, *83*, 517–519. (In Spanish) [CrossRef] [PubMed]
7. Vidal-Sanz, M.; Salinas-Navarro, M.; Nadal-Nicolás, F.M.; Alarcón-Martínez, L.; Valiente-Soriano, F.J.; Miralles de Imperial, J.; Avilés-Trigueros, M.; Agudo-Barriuso, M.; Villegas-Pérez, M.P. Understanding glaucomatous damage: Anatomical and functional data from ocular hypertensive rodent retinas. *Prog. Retin. Eye Res.* **2012**, *31*, 1–27. [CrossRef]
8. Weinreb, R.N.; Lindsey, J.D. The importance of models in glaucoma research. *J. Glaucoma* **2005**, *14*, 302–304. [CrossRef]

9. Payne, A.J.; Kaja, S.; Sabates, N.R.; Koulen, P. Neuroprotection in eye disease: Developments in translational research. *Mo. Med.* **2013**, *110*, 429–436.
10. Bailey, A.J.; Paul, R.G.; Knott, L. Mechanisms of maturation and ageing of collagen. *Mech. Ageing Dev.* **1998**, *106*, 1–56. [CrossRef]
11. Robins, S.P. Biochemistry and functional significance of collagen cross-linking. *Biochem. Soc. Trans.* **2007**, *35*, 849–852. [CrossRef] [PubMed]
12. Palko, J.R.; Morris, H.J.; Pan, X.; Harman, C.D.; Koehl, K.L.; Gelatt, K.N.; Plummer, C.E.; Komáromy, A.M.; Liu, J. Influence of age on ocular biomechanical properties in a canine glaucoma model with ADAMTS10 mutation. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0156466. [CrossRef] [PubMed]
13. Downs, J.C. Optic nerve head biomechanics in aging and disease. *Exp. Eye Res.* **2015**, *133*, 19–29. [CrossRef] [PubMed]
14. Liu, B.; McNally, S.; Kilpatrick, J.I.; Jarvis, S.P.; O'Brien, C.J. Aging and ocular tissue stiffness in glaucoma. *Surv. Ophthalmol.* **2018**, *63*, 56–74. [CrossRef] [PubMed]
15. Doucette, L.P.; Rasnitsyn, A.; Seifi, M.; Walter, M.A. The interactions of genes, age, and environment in glaucoma pathogenesis. *Surv. Ophthalmol.* **2015**, *60*, 310–326. [CrossRef]
16. Osborne, N.N.; Álvarez, C.N.; del Olmo Aguado, S. Targeting mitochondrial dysfunction as in aging and glaucoma. *Drug Discov. Today* **2014**, *19*, 1613–1622. [CrossRef]
17. Knepper, P.A.; Farbman, A.I.; Telser, A.G. Aqueous outflow pathway glycosaminoglycans. *Exp. Eye Res.* **1981**, *32*, 265–277. [CrossRef]
18. Qin, Y.; Lam, S.; Yam, G.H.F.; Choy, K.W.; Liu, D.T.L.; Chiu, T.Y.H.; Li, W.Y.; Lam, D.S.; Pang, C.P.; Fan, D.S. A rabbit model of age-dependant ocular hypertensive response to topical corticosteroids. *Acta Ophthalmol.* **2012**, *90*, 559–563. [CrossRef]
19. Ke, T.L.; Clark, A.F.; Gracy, R.W. Age-related permeability changes in rabbit corneas. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* **1999**, *15*, 513–523. [CrossRef]
20. Fuchs, M.; Scholz, M.; Sendelbeck, A.; Atorf, J.; Schlegel, C.; Enz, R.; Brandstätter, J.H. Rod photoreceptor ribbon synapses in DBA/2J mice show progressive age-related structural changes. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e44645. [CrossRef]
21. Wang, A.L.; Yuan, M.; Neufeld, A.H. Age-related changes in neuronal susceptibility to damage. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2007**, *1097*, 64–66. [CrossRef] [PubMed]
22. Nuzzi, R.; Tridico, F. Glaucoma: Biological trabecular and neuroretinal pathology with perspectives of therapy innovation and preventive diagnosis. *Front. Neurosci.* **2017**, *11*, 494. Available online: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5591842/ (accessed on 23 January 2018). [CrossRef] [PubMed]
23. Bayer, A.U.; Neuhardt, T.; May, A.C. Retinal morphology and ERG response in the DBA/2NNia mouse model of angle-closure glaucoma. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2001**, *42*, 1258–1265.
24. Almasieh, L.M.; Levin, L.A. Neuroprotection in glaucoma: Animal models and clinical trials. *Annu. Rev. Vis. Sci.* **2017**, *3*, 91–120. [CrossRef]
25. Gower, N.J.D.; Barry, R.J.; Edmunds, M.R.; Titcomb, L.C.; Denniston, A.K. Drug discovery in ophthalmology: Past success, present challenges, and future opportunities. *BMC Ophthalmol.* **2016**, *16*. Available online: http://bmcophthalmol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12886-016-0188-2 (accessed on 17 January 2018). [CrossRef] [PubMed]
26. Ding, Q.J.; Zhu, W.; Cook, A.C.; Anfinson, K.R.; Tucker, B.A.; Kuehn, M.H. Induction of trabecular meshwork cells from induced pluripotent stem cells. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2014**, *55*, 7065–7072. [CrossRef] [PubMed]
27. Fernandes, K.A.; Harder, J.M.; Williams, P.A.; Rausch, R.L.; Kiernan, A.E.; Nair, K.S.; Anderson, M.G.; John, S.W.; Howell, G.R.; Libby, R.T. Using genetic mouse models to gain insight into glaucoma: Past results and future possibilities. *Exp. Eye Res.* **2015**, *141*, 42–56. [CrossRef] [PubMed]
28. Chen, L.; Zhao, Y.; Zhang, H. Comparative anatomy of the trabecular meshwork, the optic nerve head and the inner retina in rodent and primate models used for glaucoma research. *Vision* **2016**, *1*, 4. [CrossRef]
29. Vecino, E.; Sharma, S.C. Glaucoma animal models. En: Glaucoma-basic and clinical concepts. InTech, 2011. Available online: https://www.intechopen.com/download/pdf/23828 (accessed on 3 October 2017).
30. Borghi, V.; Bastia, E.; Guzzetta, M.; Chiroli, V.; Toris, C.B.; Batugo, M.R.; Carreiro, S.T.; Chong, W.K.; Gale, D.C.; Kucera, D.J. A novel nitric oxide releasing prostaglandin analog, NCX 125, reduces intraocular pressure in rabbit, dog, and primate models of glaucoma. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* **2010**, *26*, 125–132. [CrossRef]

31. Russell, W.M.S.; Burch, R.L.; Hume, C.W. *The Principles of Humane Experimental Technique*; Methuen: London, UK, 1959; Volume 238.
32. Ollivier, F.J.; Brooks, D.E.; Kallberg, M.E.; Sapp, H.L.; Komáromy, A.M.; Stevens, G.R.; Dawson, W.W.; Sherwood, M.B.; Lambrou, G.N. Time-specific diurnal intraocular pressure curves in Rhesus macaques (*Macaca mulatta*) with laser-induced ocular hypertension. *Vet. Ophthalmol.* **2004**, *7*, 23–27. [CrossRef]
33. Weber, A.J.; Viswanathan, S. The primate model of experimental glaucoma. In *Mechanisms of the Glaucomas*; Humana Presss: New York, NY, USA, 2008; pp. 551–577.
34. Burgoyne, C.F. The non-human primate experimental glaucoma model. *Exp. Eye Res.* **2015**, *141*, 57–73. [CrossRef] [PubMed]
35. Yan, Z.; Tian, Z.; Chen, H.; Deng, S.; Lin, J.; Liao, H.; Yang, X.; Ge, J.; Zhuo, Y. Analysis of a method for establishing a model with more stable chronic glaucoma in rhesus monkeys. *Exp. Eye Res.* **2015**, *131*, 56–62. [CrossRef] [PubMed]
36. Perlman, I. Testing retinal toxicity of drugs in animal models using electrophysiological and morphological techniques. *Doc. Ophthalmol.* **2008**, *118*, 3–28. [CrossRef] [PubMed]
37. Edward, D.P.; Bouhenni, R. Anterior segment alterations and comparative aqueous humor proteomics in the buphthalmic rabbit (an American Ophthalmological Society thesis). *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.* **2011**, *109*, 66–114. [PubMed]
38. Bill, A.; Stjernschantz, J. Cholinergic vasoconstrictor effects in the rabbit eye: Vasomotor effects of pentobarbital anesthesia. *Acta Physiol. Scand.* **1980**, *108*, 419–424. [CrossRef] [PubMed]
39. Werner, L.; Chew, J.; Mamalis, N. Experimental evaluation of ophthalmic devices and solutions using rabbit models. *Vet. Ophthalmol.* **2006**, *9*, 281–291. [CrossRef] [PubMed]
40. Fiore, T.; Iaccher, B.; Pietrolucc, F.; Giansanti, F.; Cavaliere, A.; Coltella, R. Retinal toxicity of intravitreal genistein in a rabbit model: Retina. *Retina* **2010**, *30*, 1536–1541. [CrossRef] [PubMed]
41. Hysi, P.G.; Cheng, C.-Y.; Springelkamp, H.; Macgregor, S.; Bailey, J.N.C.; Wojciechowski, R.; Vitart, V.; Nag, A.; Hewitt, A.W.; Höhn, R.; et al. Genome-wide analysis of multiethnic cohorts identifies new loci influencing intraocular pressure and susceptibility to glaucoma. *Nat. Genet.* **2014**, *46*, 1126–1130. [CrossRef]
42. Takahashi, K.; Yamanaka, S. A developmental framework for induced pluripotency. *Development* **2015**, *142*, 3274–3285. [CrossRef]
43. Hockemeyer, D.; Jaenisch, R. Induced pluripotent stem cells meet genome editing. *Cell Stem Cell* **2016**, *18*, 573–586. [CrossRef]
44. Daliri, K.; Ljubimov, A.V.; Hekmatimoghaddam, S. Glaucoma, stem cells, and gene therapy: Where are we now? *Int. J. Stem Cells* **2017**, *10*, 119–128. [CrossRef] [PubMed]
45. Hadoux, J.; Desterke, C.; Féraud, O.; Guibert, M.; de Rose, R.F.; Opolon, P.; Divers, D.; Gobbo, E.; Griscelli, F.; Schlumberger, M.; et al. Transcriptional landscape of a RETC634Y-mutated iPSC and its CRISPR-corrected isogenic control reveals the putative role of EGR1 transcriptional program in the development of multiple endocrine neoplasia type 2A-associated cancers. *Stem Cell Res.* **2018**, *26*, 8–16. [CrossRef] [PubMed]
46. Aihara, M.; Lindsey, J.D.; Weinreb, R.N. Experimental mouse ocular hypertension: Establishment of the model. *Investig. Opthalmol. Vis. Sci.* **2003**, *44*, 4314–4320. [CrossRef] [PubMed]
47. Li, R.; Liu, J.H.K. Telemetric monitoring of 24 h intraocular pressure in conscious and freely moving C57BL/6J and CBA/CaJ mice. *Mol. Vis.* **2008**, *14*, 745–749. [PubMed]
48. Zanoni, D.S. Experimental Glaucoma Model (Ischemia and Reperfusion): Histology, Morphometry, Protein and Gene Espression of Apoptosis Pathway. 2015. Available online: https://repositorio.unesp.br/handle/11449/132013 (accessed on 2 October 2017).
49. Ruiz-Ederra, J.; García, M.; Hicks, D.; Vecino, E. Comparative study of the three neurofilament subunits within pig and human retinal ganglion cells. *Mol. Vis.* **2004**, *10*, 83–92.
50. Galdos, M.; Bayón, A.; Rodriguez, F.D.; Micó, C.; Sharma, S.C.; Vecino, E. Morphology of retinal vessels in the optic disk in a Göttingen minipig experimental glaucoma model. *Vet. Ophthalmol.* **2012**, *15*, 36–46. [CrossRef]
51. Middleton, S. Porcine ophthalmology. *Vet. Clin. N. Am. Food Anim. Pract.* **2010**, *26*, 557–572. [CrossRef]
52. Ruiz-Ederra, J.; García, M.; Hernández, M.; Urcola, H.; Hernández-Barbáchano, E.; Araiz, J.; Vecino, E. The pig eye as a novel model of glaucoma. *Exp. Eye Res.* **2005**, *81*, 561–569. [CrossRef]

53. Klassen, H.; Warfvinge, K.; Schwartz, P.H.; Kiilgaard, J.F.; Shamie, N.; Jiang, C.; Samuel, S.; Scherfig, E.; Prather, R.S.; Young, M.J. Isolation of Progenitor Cells from GFP-Transgenic Pigs and Transplantation to the Retina of Allorecipients. 2010. Available online: http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/clo.2008.0010 (accessed on 24 January 2018).
54. Vecino, E.; Bayón, A.; Micó, C.; Palao, C. Retrobulbar optic nerve section in pig: Optical coherence tomography (OCT) and multifocal electroretinography (MFERG) study. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2011**, *52*, 4683.
55. Richardson, R.; Tracey-White, D.; Webster, A.; Moosajee, M. The zebrafish eye—A paradigm for investigating human ocular genetics. *Eye (London)* **2017**, *31*, 68–86. [CrossRef]
56. Wiggenhauser, L.M.; Kohl, K.; Dietrich, N.; Hammes, H.-P.; Kroll, J. Studying diabetes through the eyes of a fish: Microdissection, visualization, and analysis of the adult tg(fli:EGFP) zebrafish retinal vasculature. *J. Vis. Exp.* **2017**, *2017*, e56674. Available online: https://www.jove.com/video/56674/studying-diabetes-through-eyes-fish-microdissection-visualization, (accessed on 25 January 2018). [CrossRef] [PubMed]
57. Golling, G.; Amsterdam, A.; Sun, Z.; Antonelli, M.; Maldonado, E.; Chen, W.; Burgess, S.; Haldi, M.; Artzt, K.; Farrington, S.; et al. Insertional mutagenesis in zebrafish rapidly identifies genes essential for early vertebrate development. *Nat. Genet.* **2002**, *31*, 135–140. [CrossRef] [PubMed]
58. Link, B.A.; Gray, M.P.; Smith, R.S.; John, S.W.M. Intraocular pressure in zebrafish: Comparison of inbred strains and identification of a reduced melanin mutant with raised IOP. *Investig. Opthalmol. Vis. Sci.* **2004**, *45*, 4415–4422. [CrossRef] [PubMed]
59. McMahon, C.; Semina, E.V.; Link, B.A. Using zebrafish to study the complex genetics of glaucoma. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* **2004**, *138*, 343–350. [CrossRef] [PubMed]
60. Nasevicius, A.; Ekker, S.C. Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish. *Nat. Genet.* **2000**, *26*, 216–220. [CrossRef] [PubMed]
61. Spitsbergen, J.M.; Kent, M.L. The state of the art of the zebrafish model for toxicology and toxicologic pathology research—Advantages and current limitations. *Toxicol. Pathol.* **2003**, *31*, 62–87.
62. Tremblay, F.; Parkinson, J.E. Alteration of electroretinographic recordings when performed under sedation or halogenate anesthesia in a pediatric population. *Doc. Ophthalmol.* **2003**, *107*, 271–279. [CrossRef]
63. Chaudhary, V.; Hansen, R.; Lindgren, H.; Fulton, A. Effects of telazol and nembutal on retinal responses. *Doc. Ophthalmol.* **2003**, *107*, 45–51. [CrossRef] [PubMed]
64. Gjörloff, K.; Andréasson, S.; Ehinger, B. Standardized full-field electroretinography in rabbits. *Doc. Ophthalmol.* **2004**, *109*, 163–168. [CrossRef] [PubMed]
65. Mizota, A.; Adachi-Usami, E. Effect of body temperature on electroretinogram of mice. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2002**, *43*, 3754–3757.
66. Lachapelle, P.; Benoit, J.; Guité, P. The effect of in vivo retinal cooling on the electroretinogram of the rabbit. *Visi. Res.* **1996**, *36*, 339–344. [CrossRef]
67. Wang, W.-H.; Millar, J.C.; Pang, I.-H.; Wax, M.B.; Clark, A.F. Noninvasive measurement of rodent intraocular pressure with a rebound tonometer. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2005**, *46*, 4617–4621. [CrossRef] [PubMed]
68. Johnson, B.; House, P.; Morgan, W.; Sun, X.; Yu, D.-Y. Developing laser-induced glaucoma in rabbits. *Clin. Exp. Ophthalmol.* **1999**, *27*, 180–183. [CrossRef]
69. Ollivier, F.J.; Plummer, C.E.; Barrie, K.P. Ophthalmic examination and diagnostics. Part 1: The eye examination and diagnostic procedures. In *Veterinary Ophthalmology*, 4th ed.; Blackwell Publishing: Ames, IA, USA, 2007; pp. 438–483.
70. Mabuchi, F.; Lindsey, J.D.; Aihara, M.; Mackey, M.R.; Weinreb, R.N. Optic nerve damage in mice with a targeted type I collagen mutation. *Investig. Opthalmol. Vis. Sci.* **2004**, *45*, 1841–1845. [CrossRef] [PubMed]
71. Nair, K.S.; Hmani-Aifa, M.; Ali, Z.; Kearney, A.L.; Salem, S.B.; Macalinao, D.G.; Cosma, I.M.; Bouassida, W.; Hakim, B.; Benzina, Z.; et al. Alteration of the serine protease PRSS56 causes angle-closure glaucoma in mice and posterior microphthalmia in humans and mice. *Nat. Genet.* **2011**, *43*, 579–584. [CrossRef] [PubMed]
72. Zhou, Y.; Grinchuk, O.; Tomarev, S.I. Transgenic mice expressing the tyr437his mutant of human myocilin protein develop glaucoma. *Investig. Opthalmol. Vis. Sci.* **2008**, *49*, 1932–1939. [CrossRef]
73. Senatorov, V.; Malyukova, I.; Fariss, R.; Wawrousek, E.F.; Swaminathan, S.; Sharan, S.K.; Tomarev, S. Expression of mutated mouse myocilin induces open-angle glaucoma in transgenic mice. *J. Neurosci.* **2006**, *26*, 11903–11914. [CrossRef]

74. Harada, T.; Harada, C.; Nakamura, K.; Quah, H.-M.A.; Okumura, A.; Namekata, K.; Saeki, T.; Aihara, M.; Yoshida, H.; Mitani, A.; et al. The potential role of glutamate transporters in the pathogenesis of normal tension glaucoma. *J. Clin. Investig.* **2007**, *117*, 1763–1770. [CrossRef]
75. Seo, S.; Chen, L.; Liu, W.; Zhao, D.; Schultz, K.M.; Sasman, A.; Liu, T.; Zhang, H.F.; Gage, P.J.; Kume, T. Foxc1 and Foxc2 in the neural crest are required for ocular anterior segment developmentfoxc2 in corneal and ocular surface development. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2017**, *58*, 1368–1377. [CrossRef]
76. Libby, R.T.; Smith, R.S.; Savinova, O.V.; Zabaleta, A.; Martin, J.E.; Gonzalez, F.J.; John, S.W. Modification of ocular defects in mouse developmental glaucoma models by tyrosinase. *Science* **2003**, *299*, 1578–1581. [CrossRef]
77. Kern, T.J. Rabbit and rodent ophthalmology. *Semin. Avian. Exot. Pet. Med.* **1997**, *6*, 138–145. [CrossRef]
78. Morrison, J.C.; Moore, C.G.; Deppmeier, L.M.; Gold, B.G.; Meshul, C.K.; Johnson, E.C. A rat model of chronic pressure-induced optic nerve damage. *Exp. Eye Res.* **1997**, *64*, 85–96. [CrossRef] [PubMed]
79. Levkovitch-Verbin, H.; Quigley, H.A.; Martin, K.R.; Valenta, D.; Baumrind, L.A.; Pease, M.E. Translimbal laser photocoagulation to the trabecular meshwork as a model of glaucoma in rats. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2002**, *43*, 402–410.
80. Toris, C.B.; Zhan, G.-L.; Wang, Y.-L.; Zhao, J.; Mclaughlin, M.A.; Camras, C.B.; Yablonski, M.E. Aqueous humor dynamics in monkeys with laser-induced glaucoma. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* **2000**, *16*, 19–27. [CrossRef] [PubMed]
81. Mittag, T.W.; Danias, J.; Pohorenec, G.; Yuan, H.-M.; Burakgazi, E.; Chalmers–Redman, R.; Podos, S.M.; Tatton, W.G. Retinal damage after 3 to 4 months of elevated intraocular pressure in a rat glaucoma model. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2000**, *41*, 3451–3459.
82. WoldeMussie, E.; Ruiz, G.; Wijono, M.; Wheeler, L.A. Neuroprotection of retinal ganglion cells by brimonidine in rats with laser-induced chronic ocular hypertension. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2001**, *42*, 2849–2855.
83. Ueda, J.; Sawaguchi, S.; Hanyu, T.; Yaoeda, K.; Fukuchi, T.; Abe, H.; Ozawa, H. Experimental glaucoma model in the rat induced by laser trabecular photocoagulation after an intracameral injection of India ink. *Jpn. J. Ophthalmol.* **1998**, *42*, 337–344. [CrossRef]
84. Biermann, J.; van Oterendorp, C.; Stoykow, C.; Volz, C.; Jehle, T.; Boehringer, D.; Lagrèze, W.A. Evaluation of intraocular pressure elevation in a modified laser-induced glaucoma rat model. *Exp. Eye Res.* **2012**, *104*, 7–14. [CrossRef]
85. Fortune, B.; Bui, B.V.; Morrison, J.C.; Johnson, E.C.; Dong, J.; Cepurna, W.O.; Jia, L.; Barber, S.; Cioffi, G.A. Selective ganglion cell functional loss in rats with experimental glaucoma. *Investig. Opthalmol. Vis. Sci.* **2004**, *45*, 1854–1862. [CrossRef]
86. Morrison, J.C.; Johnson, E.; Cepurna, W.O. Rat models for glaucoma research. In *Progress in Brain Research*; Nucci, C., Cerulli, L., Osborne, N.N., Bagetta, G., Eds.; Glaucoma: An Open Window to Neurodegeneration and Neuroprotection Volume 173; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2008; pp. 285–301. Available online: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0079612308011217 (accessed on 5 October 2017).
87. Samsel, P.A.; Kisiswa, L.; Erichsen, J.T.; Cross, S.D.; Morgan, J.E. A novel method for the induction of experimental glaucoma using magnetic microspheres. *Investig. Opthalmol. Vis. Sci.* **2011**, *52*, 1671–1675. [CrossRef]
88. Ruiz-Ederra, J.; Verkman, A.S. Mouse model of sustained elevation in intraocular pressure produced by episcleral vein occlusion. *Exp. Eye Res.* **2006**, *82*, 879–884. [CrossRef] [PubMed]
89. Goldblum, D.; Mittag, T. Prospects for relevant glaucoma models with retinal ganglion cell damage in the rodent eye. *Vis. Res.* **2002**, *42*, 471–478. [CrossRef]
90. Sharif, N.A. iDrugs and iDevices discovery research: Preclinical assays, techniques, and animal model studies for ocular hypotensives and neuroprotectants. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* **2018**, *34*, 7–39. Available online: http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/jop.2017.0125 (accessed on 26 January 2018). [CrossRef] [PubMed]
91. Phulke, S.; Kaushik, S.; Kaur, S.; Pandav, S. Steroid-induced glaucoma: An avoidable irreversible blindness. *J. Curr. Glaucoma Pract.* **2017**, *11*, 67–72. [CrossRef] [PubMed]
92. Overby, D.R.; Clark, A.F. Animal models of glucocorticoid-induced glaucoma. *Exp. Eye Res.* **2015**, *141*, 15–22. [CrossRef] [PubMed]
93. Nuyen, B.; Weinreb, R.N.; Robbins, S.L. Steroid-induced glaucoma in the pediatric population. *J. Am. Assoc. Pediatr. Ophthalmol. Strabismus* **2017**, *21*, 1–6. [CrossRef]

94. Beatty, J.F.; Krupin, T.; Nichols, P.F.; Becker, B. Elevation of intraocular pressure by calcium channel blockers. *Arch. Ophthalmol.* **1984**, *102*, 1072–1076. [CrossRef] [PubMed]
95. Zhang, X.; Ognibene, C.M.; Clark, A.F.; Yorio, T. Dexamethasone inhibition of trabecular meshwork cell phagocytosis and its modulation by glucocorticoid receptor β. *Exp. Eye Res.* **2007**, *84*, 275–284. [CrossRef]
96. Knepper, P.A.; Breen, M.; Weinstein, H.G.; Blacik, L.J. Intraocular pressure and glycosaminoglycan distribution in the rabbit eye: Effect of age and dexamethasone. *Exp. Eye Res.* **1978**, *27*, 567–575. [CrossRef]
97. Acott, T.S.; Westcott, M.; Passo, M.S.; van Buskirk, E.M. Trabecular meshwork glycosaminoglycans in human and cynomolgus monkey eye. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **1985**, *26*, 1320–1329.
98. Benozzi, J.; Nahum, L.P.; Campanelli, J.L.; Rosenstein, R.E. Effect of hyaluronic acid on intraocular pressure in rats. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2002**, *43*, 2196–2200.
99. Moreno, M.C.; Marcos, H.J.A.; Oscar Croxatto, J.; Sande, P.H.; Campanelli, J.; Jaliffa, C.O.; Benozzi, J.; Rosenstein, R.E. A new experimental model of glaucoma in rats through intracameral injections of hyaluronic acid. *Exp. Eye Res.* **2005**, *81*, 71–80. [CrossRef] [PubMed]
100. Liu, J.H.; Kripke, D.F.; Hoffman, R.E.; Twa, M.D.; Loving, R.T.; Rex, K.M.; Gupta, N.; Weinreb, R.N. Nocturnal elevation of intraocular pressure in young adults. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **1998**, *39*, 2707–2712.
101. Benozzi, J.; Jaliffa, C.O.; Lacoste, F.F.; Llomovatte, D.W.; Sarmiento, M.I.K.; Rosenstein, R.E. Effect of Brimonidine on rabbit trabecular meshwork hyaluronidase activity. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2000**, *41*, 2268–2272.
102. Rosenbaum, D.M.; Degterev, A.; David, J.; Rosenbaum, P.S.; Roth, S.; Grotta, J.C.; Cuny, G.D.; Yuan, J.; Savitz, S.I. Necroptosis, a novel form of caspase-independent cell death, contributes to neuronal damage in a retinal ischemia-reperfusion injury model. *J. Neurosci. Res.* **2010**, *88*, 1569–1576. [CrossRef]
103. Herrera, D. *Clinical ophthalomology in companion animals*, 2nd ed.; Inter-Medica: Buenos Aires, Argentina, 2016; 276p.
104. Ito, Y.A.; Belforte, N.; Cueva Vargas, J.L.; Di Polo, A. A magnetic microbead occlusion model to induce ocular hypertension-dependent glaucoma in mice. *J. Vis. Exp.* **2016**, *109*, e53731. Available online: http://www.jove.com/video/53731/a-magnetic-microbead-occlusion-model-to-induce-ocular-hypertension (accessed on 11 October 2018). [CrossRef]
105. Morgan, J.E.; Tribble, J.R. Microbead models in glaucoma. *Exp. Eye Res.* **2015**, *141*, 9–14. [CrossRef]
106. Guedes, G.; Tsai, J.C.; Loewen, N.A. Glaucoma and aging. *Curr. Aging Sci.* **2011**, *4*, 110–117. [CrossRef]
107. Mead, B.; Amaral, J.; Tomarev, S. Mesenchymal stem cell–derived small extracellular vesicles promote neuroprotection in rodent models of glaucoma. *Investig. Opthalmol. Vis. Sci.* **2018**, *59*, 702–714. [CrossRef]

© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

CONCLUSIONES

- Aunque el sistema inmunitario del conejo es diferente al de los humanos, esta especie ha emergido como un modelo valioso para el estudio del glaucoma, ofreciendo similitudes fenotípicas relevantes, como la elevación de la PIO y la buftalmia, así como similitudes histopatológicas en la morfología del nervio óptico y el ángulo de la cámara anterior
- Los conejos, especialmente aquellos de la raza Nueva Zelanda, pueden desarrollar formas congénitas de glaucoma que replican características observadas en pacientes humanos, lo que los convierte en modelos particularmente útiles para investigar los mecanismos y posibles tratamientos de esta enfermedad.
- A pesar de los desafíos éticos y técnicos que plantea el uso de modelos animales, este es esencial para comprender mejor la fisiopatología del glaucoma y desarrollar terapias más efectivas.

➢ *RESULTADOS FASE EXPERIMENTAL MODELO HO*

En todos los grupos se midió la PIO en ambos ojos durante un periodo de 9 semanas. Para la inducción del modelo de HO se aplicaron tratamientos tópicos (dos veces al día) y subconjuntivales (una vez por semana) durante 5 semanas. Se observó un aumento significativo de la PIO en los grupos de HO (G1 y G3) en comparación con el grupo control ($P<0.001$, ANOVA de Kruskal-Wallis). Sin embargo, en el grupo G2, la PIO se mantuvo en una media de 12.07 ± 2.21 mmHg, sin diferencias significativas respecto al grupo control (11.98 ± 1.58 mmHg). La PIO en el grupo control no presentó diferencias significativas a lo largo del estudio ($P>0.05$, ANOVA de Kruskal-Wallis).

En la tabla descrita a continuación (ver tabla 7), se observa que los grupos de HO alcanzaron PIOs significativamente más elevadas (G1: 25.22 ± 12.31 [13.0 – 64.0] mmHg y G3: 19.16 ± 4.47 [11.0 – 42.0] mmHg, $P<0.05$, ANOVA de Kruskal-Wallis) en comparación con G2 (13.33 ± 3.32 [7.0 – 25.0] mmHg) a lo largo del estudio.

Tabla 7: Estadística descriptiva observada en los grupos de investigación.

Grupo	Ojo experimental	Media PIO y DE (mmHg)	Máxima (mmHg)	Mínima (mmHg)
G1	control	12.42 ± 1.85[7.0-21.0]	13.32 ± 1.08[8.0-16.0]	10.01 ± 1.11[7.0-20.0]
	OD	16.32 ± 9.17[8.0-26.0]	25.22 ± 12.31[13.0-64.0]	10.49 ± 2.49[4.0-17.0]
G2	control	11.98 ± 1.58[7.0-16.0]	12.49 ± 1.96[7.0-21.0]	11.35 ± 1.72[6.0-19.0]
	OD	12.07 ± 2.21[9.0-21.0]	13.33 ± 3.32[7.0-25.0]	10.77 ± 1.61[6.0-16.0]
G3	control	11.59 ± 1.89[7.0-15.0]	12.34 ± 2.06[7.0-16.0]	10.77 ± 1.61 [7.0-20.0]
	OD	14.2 ± 4.68[8.0-30.0]	19.16 ± 4.47[11.0-42.0]	10.20 ± 3.07[0.0-17.0]

Análisis Kruskal-Wallis Anova seguidos por prueba Wilcoxon. Media/ **DE:** ± Desviación Estándar. Rango intercuartílico: []. *$P \leq 0.05$. **G1**: HO; **G2:** WJ-MSCs y **G3**: HO + WJ-MSCs; **OD**: experimental; **OI**: control

Al analizar la evolución de la PIO en los grupos de HO, se observó en G1 un aumento significativo (13.1 ± 2.2 [8.0 - 21.0] mmHg, P<0.001, ANOVA de Kruskal-Wallis) a partir de la semana 3, que se mantuvo elevado hasta la semana 9 (18.1 ± 9.9 [12.0 - 45.0] mmHg) (ver fgura 41). En G3, la PIO también mostró un aumento significativo a partir de la semana 3 (13.3 ± 3.9 [8.0 - 30.0] mmHg, P<0.001, ANOVA de Kruskal-Wallis). Sin embargo, se observó una reducción en la PIO a partir de la semana 8, llegando a valores dentro de la normalidad al final del estudio (13.21 ± 3.19 [2.0 - 25.0] mmHg).

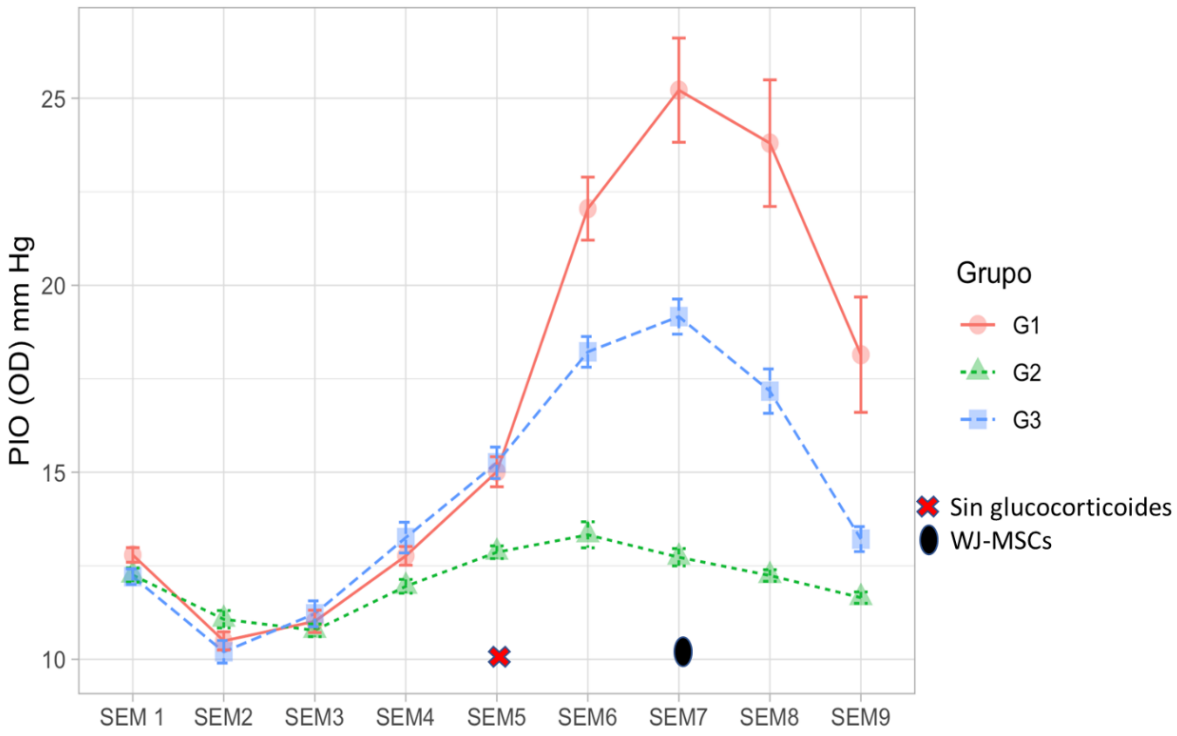


Figura 41: Gráfico demostrando medidas de PIO en los grupos experimentales. Aumento de la PIO entre las semanas 1 y 9 (G1 y G3). G2 mantiene constante la PIO durante el trascurso del estudio. Se observó una disminución la PIO en G3 a partir de la semana 8. Diferencias significativas son observadas al comparar los grupos durante las semanas. **G1**: HO; **G2:** WJ-MSCs y **G3**: HO + WJ-MSCs; **OD**: experimental. *P*≤ 0.05.

Al examinar el comportamiento individual de los animales frente al incremento de la PIO en los grupos de HO, se detectó en G1 un mayor aumento en tres animales, en comparación con dos en G3. Después de 5 semanas de aplicación de glucocorticoides, se observó una tendencia al aumento de la PIO reflejada en las semanas 6 (22.0 ± 7.8 [13.0 - 66.0] mmHg) y 7 (25.2 ± 12.3 [13.0 - 64.0] mmHg) en G1. En G3, se observó una tendencia similar en la semana 6 (18.2 ± 3.9 [10.0 - 29.0] mmHg) y semana 7 (19.16 ± 4.47 [11.0 - 42.0] mmHg).

- **Período del día**

La PIO fue medida en los periodos de mañana y tarde por el mismo evaluador. No se observaron diferencias significativas relacionadas con el periodo del día (P>0.05, ANOVA de Kruskal-Wallis) al evaluar el ojo experimental en todos los grupos del estudio (ver figura 42). Sin embargo,

todos los grupos presentaron una PIO ligeramente más alta en la tarde (T) en comparación con la mañana (M): G1 (M: 16.33 ± 9.78 mmHg y T: 16.37 ± 8.53 mmHg, P=0.962), G2 (M: 12.05 ± 2.25 mmHg y T: 12.1 ± 2.18 mmHg, P=0.486) y G3 (M: 13.97 ± 4.69 mmHg y T: 14.43 ± 4.67 mmHg, P=0.06), aunque esta diferencia no fue significativa, lo que demuestra que los animales estaban debidamente aclimatados.

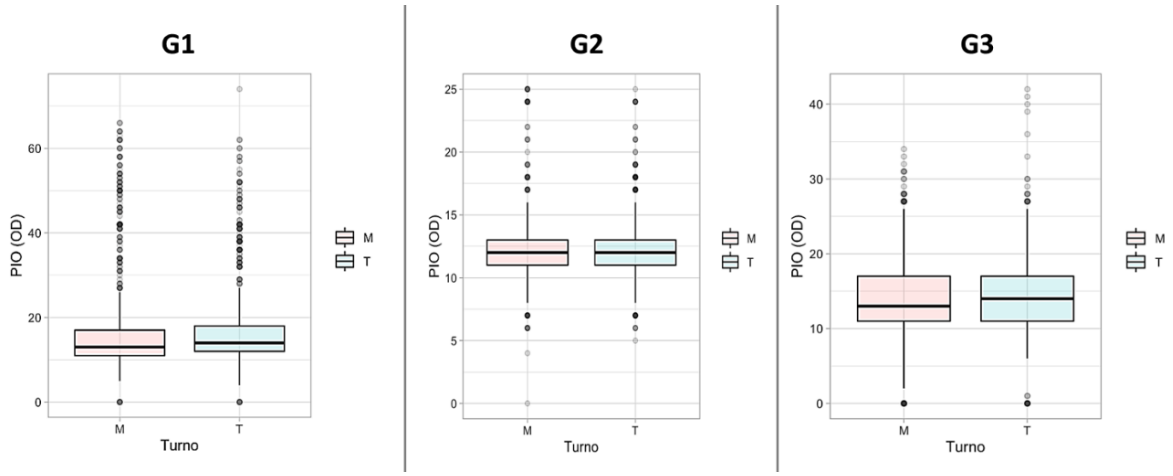


Figura 42: **Gráficos BloxPlot demostrando medidas de PIO durante el día**. Sin diferencias significativas entre los grupos estudiados. **G1**: HO; **G2:** WJ-MSCs y **G3**: HO + WJ-MSCs; **OD**: experimental. Análisis Kruskal-Wallis Anova. *P*≤ 0.05.

- **Evaluación clínica del modelo experimental: Exploración Oftalmológica**

Con el objetivo de identificar posibles cambios oftalmológicos derivados del desarrollo del modelo experimental propuesto, se realizó un examen oftalmológico completo todos los días antes de la inducción de HO. Al evaluar el segmento anterior mediante lámpara de hendidura, se prestó especial atención a la curvatura corneal y cualquier irregularidad en la superficie corneal asociada al uso de anestesia tópica. En este estudio, la aplicación de anestesia tópica para la medición de la PIO, demostró ser adecuada, sin alterar los resultados de la medición de PIO.

Durante las 5 semanas de inducción de HO, no se observaron alteraciones en los anexos oculares ni signos de blefaroespasmo, epífora o fotofobia que indicaran dolor o malestar en los grupos G1 y G3. Sin embargo, entre las semanas 6 y 7 del estudio, *antes* de la aplicación de MSCs derivadas de la gelatina de Wharton (WJ-MSCs), se observó que un animal del grupo G3 presentaba hiperemia conjuntival intensa, leve edema corneal, rubeosis iridis e iritis. En la semana 9, estos signos clínicos cambiaron, mostrando menor hiperemia conjuntival, un iris opaco de coloración

verde grisácea y edema corneal. Los demás animales de este grupo no presentaron alteraciones. En el grupo G2, solo un animal presentó hiperemia conjuntival un día después del trasplante celular en la semana 7 y midriasis sin respuesta a la intensidad de luz en la semana 9 (ver figura 43). Los demás animales de este grupo no presentaron alteraciones.

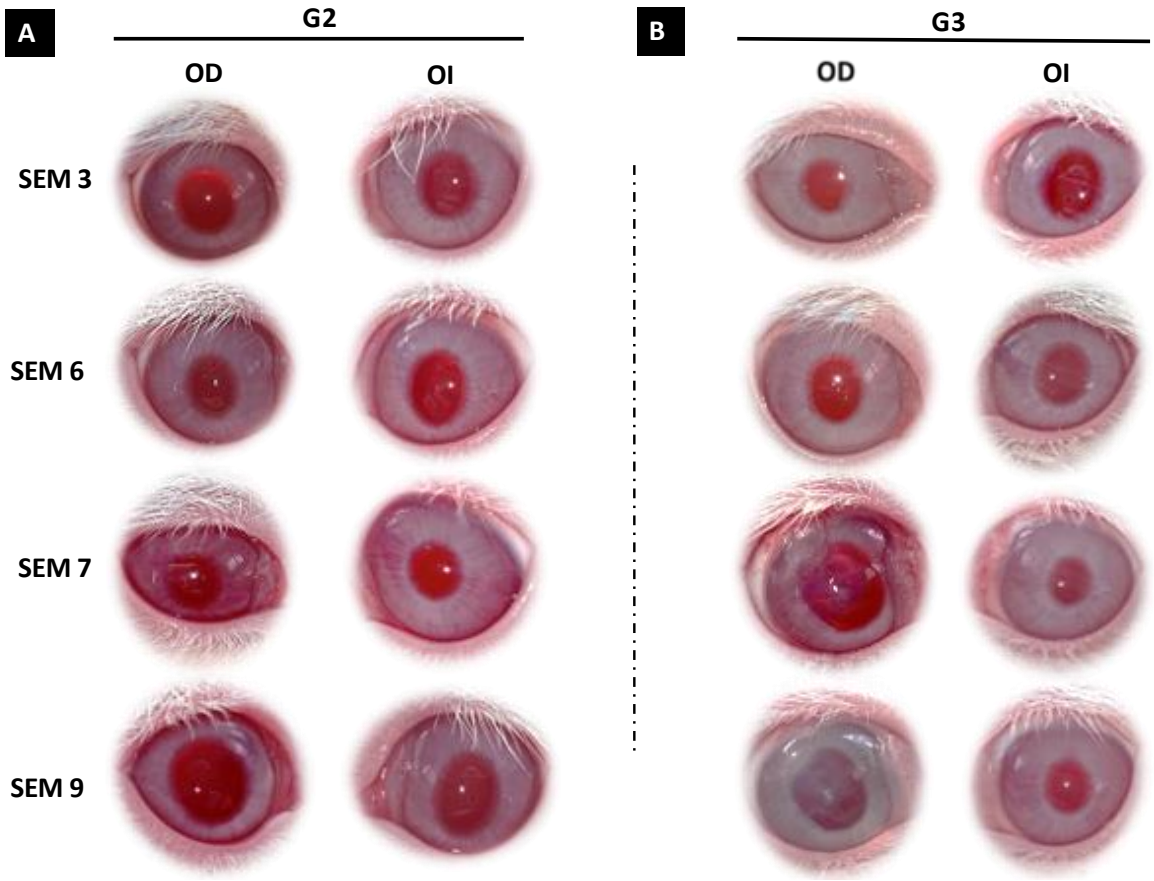


Figura 43: Cambios oftalmológicos observados en el modelo animal experimental en el transcurso del estudio *post* aplicación intravítrea de WJ-MSCs. Sin alteraciones evidentes hasta semana 6 del estudio en ambos grupos. **A)** G2: leves cambios oftalmológicos en semana 7 y midriasis en semana 9 y **B)** G3: signos inflamatorios en cornea e iris en la semana 7. Alteraciones en coloración del iris en semana 9. **G2**: WJ-MSCs; **G3**: HO + WJ-MSCs; **OD**: experimental; **OI**: control. **Fuente**: *Archivo personal*

Para evitar una evaluación incorrecta de la magnitud de la inflamación en el animal que presentó cambios en el segmento anterior en G3, se trató la lesión únicamente con pomada de ciprofloxacino, logrando una resolución progresiva y espontánea de la inflamación al término del estudio. El conejo no mostró alteraciones en su comportamiento atribuibles a la clínica oftalmológica, manteniendo un nivel normal de ingesta y actividad, por lo que no fue necesaria su

salida del estudio mediante eutanasia paliativa. La decisión de no retirarlo del estudio y no administrar analgesia fue tomada junto con el equipo responsable. En relación con la colecta de humor acuoso, se observó un leve edema corneal asociado al punto de colecta en un solo conejo del grupo G3 entre las semanas 6 y 7, siendo el mismo animal que presentó signos en el segmento anterior descritos anteriormente. En este estudio, no se evidenciaron complicaciones relacionadas con la colecta de humor acuoso, como hernia de iris, hifema, catarata capsular anterior asociada al contacto de la aguja con la lente durante la punción. Al evaluar el segmento posterior mediante retinografía, se observó que los animales con PIO más alta presentaron un mayor número de alteraciones en el segmento posterior del ojo en el grupo G1 (ver figura 44).

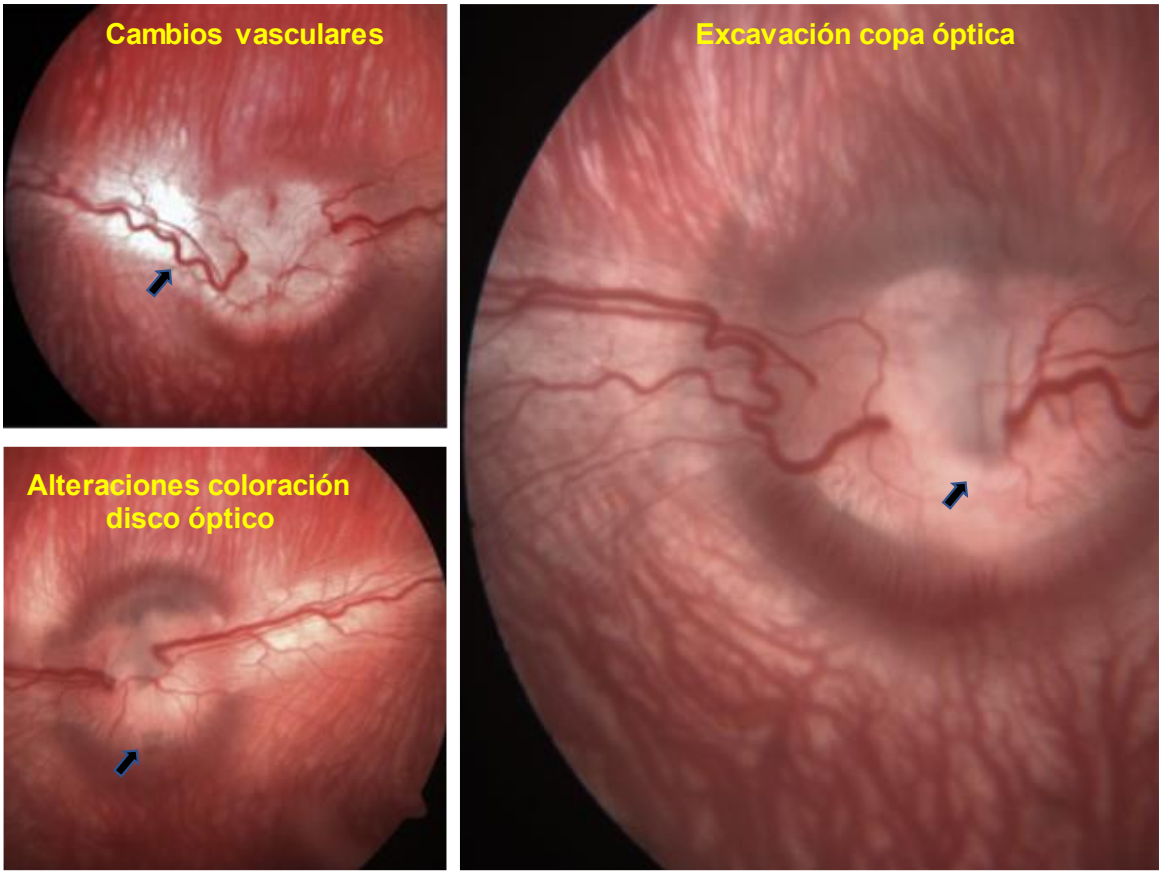


Figura 44: Retinografía: evaluación del segmento posterior en el grupo de HO. Presencia de alteraciones vasculares, excavación del nervio óptico y alteraciones en el disco óptico fueron evidenciados en G1 en la semana 9 del estudio. **G1**: HO. **Fuente**: *Archivo personal.*

Después de la aplicación intravítrea de WJ-MSCs, no se observaron anomalías ni inflamación de la retina o del disco óptico en el segmento posterior en G3 en comparación con la semana 1. Sin embargo, se observó la solución enriquecida con células estromales ubicada sobre la cabeza del nervio óptico en G3. En G1, se observó dilatación y tortuosidad vascular, además de cambios en la cabeza del nervio óptico. En G2, se observó hemorragia intravítrea en un solo animal, mientras que los demás no presentaron alteraciones (ver figura 45).

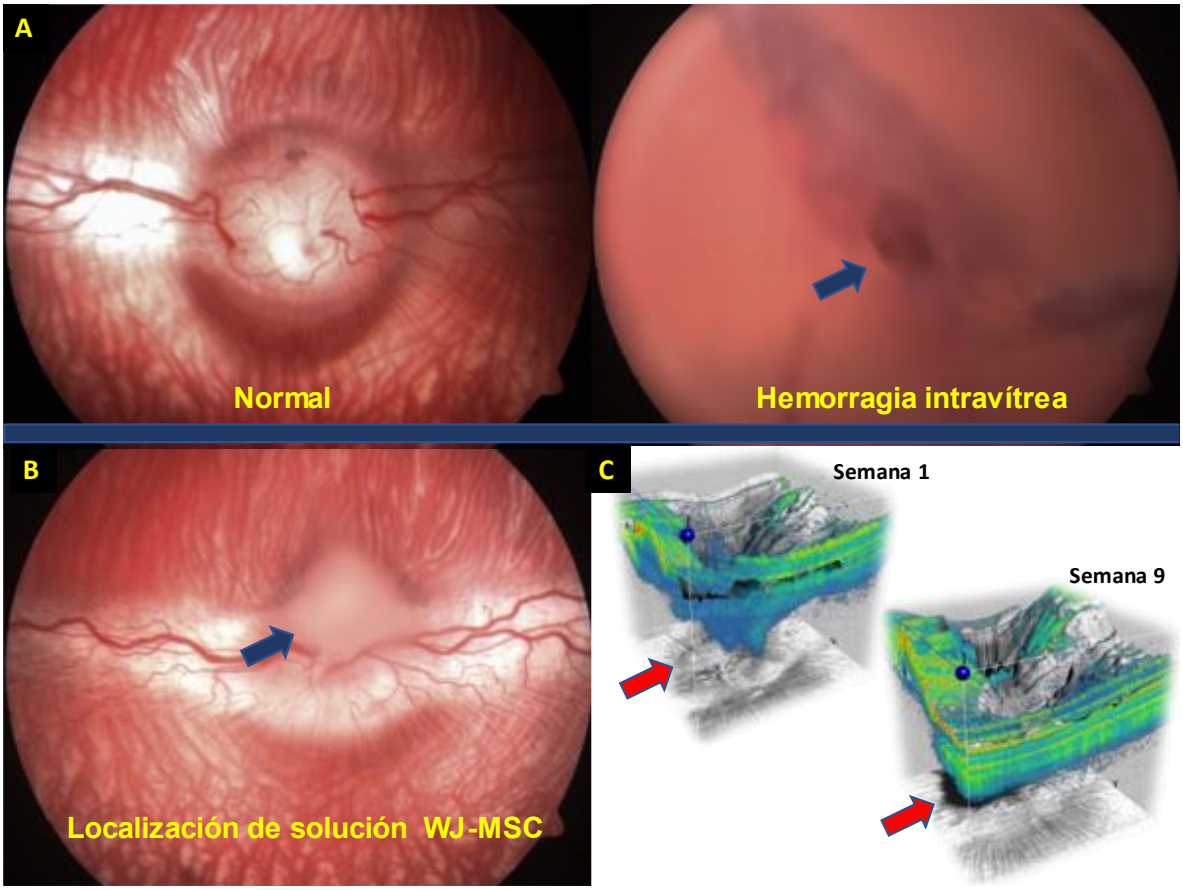


Figura 45: Evaluación del segmento posterior en los grupos trasplantados con WJ-MSCs. A) G2: Antes de la inyección intravítrea (semana 1) y presencia de hemorragia intravítrea semana 9; **B)** G3: localización de la solución WJ-MSCs sobre el nervio óptico en retinografía y **C)** G3: observación del nervio óptico en OCT 3D semana 1 y semana 9. Flecha: Vista frontal de la retina y nervio óptico: presencia de solución trasplantada intravítrea sobre el nervio óptico. **G2:** WJ-MSCs y **G3**: HO + WJ-MSCs. **Fuente**: *Archivo personal.*

- **CAPÍTULO 2: "Describir los cambios morfológicos y funcionales observados en la retina y el nervio óptico en el modelo experimental de HO antes y después de la intervención con MSCs"**

- Cambios Morfológicos

ANEXO 2: Tomografía Coherencia Óptica

❖ INTRODUCCIÓN

Con el propósito de examinar los cambios morfológicos tempranos en el modelo de HO y los efectos del trasplante intravítreo de MSCs derivadas de WJ-MSCs, se empleó la técnica de tomografía de coherencia óptica (OCT). En la OCT, el grosor de la capa de fibras nerviosas de la retina (CFNR) se considera un indicador clave para evaluar la salud e integridad de las fibras nerviosas retinianas. Las variaciones en este grosor pueden proporcionar información relevante sobre la presencia y la gravedad de diversas condiciones oculares y neurológicas.El volumen de la copa óptica también se ve afectado en casos de glaucoma debido a los cambios en la morfología del disco óptico. La progresión de la enfermedad provoca un aumento en el volumen de la copa óptica, resultado de la pérdida progresiva de las CGRs y de las fibras nerviosas, lo cual conduce al ensanchamiento y excavación del nervio óptico.

El área del disco óptico, visualizada en la OCT como una región circular o elíptica, representa el sitio de emergencia de las fibras nerviosas de la retina que forman el nervio óptico. Los cambios en esta área, ya sea un incremento o una disminución, son marcadores importantes de la progresión y gravedad del glaucoma. Estos cambios pueden emplearse para evaluar la efectividad de los tratamientos y monitorear la enfermedad a lo largo del tiempo. Por otro lado, El área del disco óptico, visualizada en la OCT como una región circular o elíptica, representa el sitio de emergencia de las fibras nerviosas de la retina que forman el nervio óptico. Los cambios en esta área, ya sea un incremento o una disminución, son marcadores importantes de la progresión y gravedad del glaucoma. Estos cambios pueden emplearse para evaluar la efectividad de los tratamientos y monitorear la enfermedad a lo largo del tiempo.

En el contexto del glaucoma, el grosor de la capa de las CCGR evaluado mediante OCT suele mostrar un adelgazamiento progresivo, lo que indica la pérdida de CGR. La monitorización del grosor de la CCGR por medio de OCT es crucial para diagnosticar y seguir la evolución del glaucoma, así como para evaluar la efectividad de las intervenciones terapéuticas dirigidas a preservar las CGR y

prevenir la pérdida de visión. Nuestro estudio demostró que la OCT es un método no invasivo para los animales, ya que no requiere la administración de anestesia general para su realización. Además, no se presentaron dificultades significativas en la adquisición y procesamiento de las imágenes OCT. Se llevaron a cabo mediciones de la cabeza del nervio óptico en los grupos durante las semanas 1, 4 y 9 del estudio utilizando el equipo Cirrus HD-OCT.

Artículo II

Veterinary World, EISSN: 2231-0916
Available at www.veterinaryworld.org/Vol.17/February-2024/29.pdf

RESEARCH ARTICLE
Open Access

Early detection of optic nerve head changes using optical coherence tomography after using mesenchymal stromal cells as intravitreal therapy in rabbit models of ocular hypertension

Karine dos Santos Evangelho[1], Carlos Cifuentes-González[2], William Rojas-Carabali[2], Clemencia De Vivero-Arciniegas[3], Mariana Cañas-Arboleda[4], Gustavo Salguero[4], Carolina Ramírez-Santana[5], and Alejandra de-la-Torre[2]

1. Doctoral Program in Biomedical and Biological Sciences, School of Medicine and Health Sciences, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia; 2. Neuroscience (NEUROS) Research Group, Neurovitae Research Center, Institute of Translational Medicine (IMT), School of Medicine and Health Sciences, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia; 3. Higher School of Ophthalmology- -Instituto Barraquer de América, Bogotá, Colombia; 4. Advanced Therapies Unit, Instituto Distrital de Ciencia Biotecnología e Innovación en Salud-IDCBIS, Bogotá, Colombia; 5. Center for Autoimmune Diseases Research (CREA), School of Medicine and Health Sciences, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia.

Corresponding author: Alejandra de-la-Torre, e-mail: alejadelatorre@yahoo.com

Co-authors: KSE: evangelho.karine@gmail.com, CCG: carlosh.cifuentesg@gmail.com, WRC: warcinvest@gmail.com, CDVA: cledevi@gmail.com, MCA: mcanas@idcbis.org.co, GS: gsalguero@idcbis.org.co, CRS: heily.ramirez@urosario.edu.co

Received: 18-09-2023, **Accepted:** 30-01-2024, **Published online:** 29-02-2024

doi: www.doi.org/10.14202/vetworld.2024.500-508 **How to cite this article:** Evangelho KS, Cifuentes-González C, Rojas-Carabali W, Vivero-Arciniegas CD, Cañas-Arboleda M, Salguero G, Ramírez-Santana C, and de-la-Torre A (2024) Early detection of optic nerve head changes using optical coherence tomography after using mesenchymal stromal cells as intravitreal therapy in rabbit models of ocular hypertension, *Veterinary World*, 17(2): 500–508.

Abstract

Background and Aim: Stem cell therapy is considered a promising treatment for several neurodegenerative diseases. However, there are very few studies on the use of this therapy in glaucoma models. By detecting the changes produced by glaucoma early, cell therapy could help prevent the events that lead to blindness. In this study, early changes in the optic nerve head (ONH) as detected by optical coherence tomography (OCT) after the application of human Wharton's jelly-derived mesenchymal stromal cells (hWJ-MSCs) in an experimental model of ocular hypertension (OH) were evaluated.

Materials and Methods: Fifteen New Zealand rabbits were randomly divided into the following three groups: G1: OH, G2: hWJ-MSCs, and G3: OH + hWJ-MSCs. An OH model was constructed, and the intraocular pressure (IOP) was measured regularly. At week 7, 10^5/100 µL hWJ-MSCs were intravitreally injected. Retinography and OCT were used to evaluate structural changes in ONH.

Results: IOP increased significantly in G1 and G3 from week 3 onward. Retinography revealed more significant optic nerve changes, that is, papillary asymmetry suggestive of optic nerve excavation, vascular alterations, and irregular hypopigmentation peripheral to the optic disk margin, in G1 compared with G3. OH locates the hWJ-MSCs solution in the vitreous in front of the optic nerve. OCT revealed retinal nerve fiber layer (RNFL) reduction in all groups, reduced optic cup volume in G2 and G3 between weeks 1 and 9, and significant ganglion cell layer thickness reduction in G1 and a slight increase in G3.

Conclusion: Intravitreal hWJ-MSCs injection produced changes in optic cup volume, which were detected early on by OCT; however, RNFL could not be restored in this OH model.

Keywords: glaucoma, mesenchymal stromal cell, ocular hypertension, optic nerve head, optical coherence tomography, rabbit.

Introduction

Glaucoma is a neuropathy characterized by a loss of the retinal nerve fiber layer (RNFL) and alterations in the optic nerve head (ONH), resulting in visual loss [1]. Intraocular hypertension is the main modifiable risk factor for glaucoma; it can lead to ONH cupping and RNFL thinning when the disease is moderately advanced. Diagnosing the early stages of glaucoma can be challenging due to the misinterpretation of changes in ONH and RNFL during its initial stages, leading to clinical misdiagnosis [2]. Early detection and treatment of glaucoma are essential for preventing disease progression; neuroprotective therapies can be used to prevent rapid and irreversible cascade of events that ultimately lead to blindness [3]. Optical coherence tomography (OCT) can provide an objective and reliable structural assessment of ONH and RNFL because they are important structures for early diagnosis and disease monitoring. OCT images in previous studies have accurately reflected glaucoma histopathology in animal models of retinal disease [4, 5].

Although there is no cure for glaucoma, early treatment can often delay the damage and protect vision [6, 7]. Using stem cells as a neuroprotective agent for retinal ganglion cells (RGCs) provides a promising approach [8]. In this context, the use of

Copyright: Evangelho, *et al*. Open Access. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

neuroprotective therapies in glaucoma could be beneficial in preventing neuronal damage, complementing standard treatment, and enhancing patients' quality of life by helping to preserve functional vision and reducing the risk of irreversible visual impairment. Mesenchymal stromal cells (MSCs) can be used as a neuroprotective therapy due to their multipotent self-replication ability, low immunogenicity, and ease of isolation and expansion [9]. Also, their paracrine properties [10] are known to secrete various neuroprotective proteins that promote damaged RGC survival and regeneration in eyes affected by glaucoma [11]. Numerous studies have reported that MSCs can mitigate retinal inflammation promoted by T-cells, thereby providing protective benefits for damaged retinal tissue [8]. However, the use of MSCs in an immunosuppressive environment, such as glucocorticoid (GC)-induced ocular hypertension (OH), has not yet been reported.

Therefore, the aim of this study was to use OCT and retinography to examine the initial effects on ONH produced by GCs following intravitreal application of MSCs in an OH model.

Materials and Methods

Ethical approval

All experimental and animal care procedures were conducted in accordance with the Association for Research in Vision and Ophthalmology Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research and approved by the Animal Ethics Committee of the Higher School of Ophthalmology - Instituto Barraquer de América – reference C-20190226-1. The Animal Research: Reporting of *in vivo* Experiments guidelines were followed in this study.

Study period and location

This study was conducted from March to July 2021 at the Higher School of Ophthalmology - Instituto Barraquer de América, Colombia.

Animals

The rabbits used in this study were provided by Sentagro E.A.T./NIT: 900131278-7. The study used 15 New Zealand male rabbits aged approximately 4 months and weighing 2–3 kg. Animals were housed according to National Institutes of Health guidelines. Before inclusion in this study, all animals underwent a complete ocular examination to rule out the presence of ocular disease. Intraocular pressure (IOP) measurements were performed by applanation tonometry (Tono-Pen AVIA Vet/Reichert, Depew, New York, USA), slit-lamp biomicroscopy of the anterior segment (SL-15/Kowa, Tokyo, Japan), direct ophthalmoscopy (Welch Allyn, Skaneateles Falls, WA, USA), and indirect ophthalmoscopy (Vantage Plus binocular, Keeler, UK).

Animals suffering from ocular surface diseases such as chronic keratitis or conjunctivitis of any etiology (including dry eye syndrome and systemic inflammatory disorders) and opacity of the lens were excluded from this study. Three intervention groups with five animals each were assigned as follows: Group 1 contained animals suffering OH, Group 2 rabbits receiving human Wharton's jelly-derived mesenchymal stromal cells (hWJ-MSCs), and Group 3 rabbits receiving hWJ-MSCs (OH+hWJ-MSCs).

Anesthesia procedure

The rabbits were anesthetized with an intramuscular injection of 35 mg/kg ketamine (Ketafine, Brouwer, Argentina) and 8 mg/kg xylazine (2% Xilacina, Erma, Colombia) before receiving an intravitreal injection of hWJ-MSCs. A 0.5% proparacaine anesthetic eye drop (Alcaine, Alcon, Barcelona) was used before subconjunctival GC injection. Artificial tears (Splash Tears, Sophia, Colombia) were instilled daily to reduce possible complications related to topical anesthesia. A slit lamp was used to analyze the ocular surface to detect possible corneal alterations (topical anesthesia was used).

OH Induction

OH was induced in ten eyes, five eyes G1, and five eyes G3. Topical prednisolone acetate drops (10 mg/mL Prednefrin Forte Eye drops, Allergan, Brazil) were used twice a day to raise and maintain elevated IOP. This was associated with weekly subconjunctival injections of 0.5 mL betamethasone acetate (Celestone Chronodose, 3 + 3 mg/mL disodium phosphate, Schering-Plough, Mexico) [12, 13] in the right eye for 5 weeks, with the left eye used as the control.

Measurement of IOP

An applanation tonometer (Tono-Pen AVIA Vet/Reichert) was used to measure both eyes' IOP for 9 consecutive weeks. IOP was measured twice daily (at 7:00 am and 4:00 pm) in both eyes of all the experimental animals. The animals had minimal head and neck restraint; excessive pressure on the eyelids and neck was avoided. Five readings were taken for each eye and then averaged. The starting eye was randomly selected and tonometry was performed by the same examiner in all cases. OH was considered to be >15 mmHg, based on normal IOP in rabbits [14].

Isolation and culturing hWJ-MSCs

Umbilical cord samples were collected from full-term births (cesarean and vaginal deliveries). Informed consent was obtained from healthy donors before samples were collected (acceptance reference 2019EE44993). Bogotá's District Secretary of Health's Ethics Committee approved the informed consent form. hWJ-MSCs were isolated as previously described by Silva-Cote *et al.* [15] and Cañas-Arboleda *et al.* [16]. Umbilical cord fragments were washed in 0.9% saline solution with 10,000 U/mL 1% penicillin/streptomycin, and umbilical veins, arteries, and outer membranes were removed. Wharton's jelly was minced and cultured in flasks containing Dulbecco's Modified

Eagle's Medium low glucose (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), 10,000 U/mL 1% penicillin/streptomycin supplemented with 10% human platelet lysate plus 8 IU/mL heparin. hWJ-MSCs cultures were maintained at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO_2. Cultures with 80% confluency were harvested, and hWJ-MSCs expanded until passage 3 was used in subsequent experiments.

hWJ-MSCs quality control

hWJ-MSCs were immunophenotypically characterized by labeling the cells with anti-CD90-APC, -CD73-PE/Cy7, -CD105-PE, -CD274-PE, -CD45-APC/Cy7, -CD34-PerCP-Cy5.5, and -CD31-PE antibodies (Biolegend, San Diego, USA). T-cell depletion lymphocytes ($TCD3^+$) inhibition was evaluated and cell suspensions were analyzed for sterility, endotoxins, and mycoplasma. A FACSCanto II cytometer (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) and FlowJo vX.7.0 software (TreeStar, USA) was used for flow cytometry and data analysis, respectively.

Intravitreal injection of hWJ-MSCs

Animals in groups 2 and 3 received a single intravitreal injection of hWJ-MSCs suspension at week 7 of the study. hWJ-MSCs were supplied in single-dose cryotube vials that had been previously thawed. After general anesthesia in sterile conditions, the hWJ-MSCs suspension (1×10^5 cells/100 µL) [17] was gently injected into the vitreous cavity with a 30-gauge needle entering the globe through the pars plana in the direction of the optic disk. A sterile irrigating solution (balanced salt solution) was then intravitreally injected into the control eye (left).

Retinography

A Zeiss Ff-450 Plus IRu (FF 450^{plus} Fundus Camera with VISUPAC™ Digital Imaging System, Zeiss, German, UK) fundus camera was used to take photographs of the right eye fundus at weeks 1 and 9 of all the animals studied. The rabbits were carefully held to capture the images and their eyes were placed close to 10 cm from the photographic equipment. Anatomical parameters, that is, papillary asymmetry (observation of optic cup diameter and optic disk diameter), were used as indicators of optic nerve abnormalities between weeks 1 and 9 of the study. The animals were not anesthetized for this study.

OCT images

All examinations were performed in dilated eyes (1% tropicamide (Mydriacyl, Alcon, Colombia)), and the corneas were kept moist with artificial tears (Splash Tears). A Zeiss Cirrus HD-OCT (Software version 3.0.0.64; Carl Zeiss Meditec, Dublin, CA, USA) was used for imaging based on protocols described for the species [5, 18, 19]. Photographs were obtained from conscious animals using minimal manual restraint; all animals' retinal and optic nerve images were recorded. Paracentral B-scans located 3 mm ventral optic disk (visual streaks) to the ONH were acquired. Only scans with an intensity signal >5 and without eye movements were used for analysis; 5 µm axial and 15 µm transversal scans were performed. Scan circles and caliper functions were fitted for ONH measurements. We analyzed the following ONH parameters: average RNFL thickness, disk area, and the vertical and horizontal relationship between the cup, disk, and cup volume. The ganglion cell layer (GCL) was measured in visual streaks using a macular cube; OCT variations were compared throughout the study period.

Statistical analysis

Data analysis was performed using a Jamovi statistical spreadsheet (version 2) (Jamovi, 2021; https://www.jamovi.org/); the results are presented as means, standard deviations, and interquartile ranges. The Shapiro-Wilk normality test was used to determine the changes in data distribution by group during weekends. Repeated-measures analysis of variance (ANOVA) was used in cases of normal distribution, whereas Friedman test was used for non-normal distributions. Repeated measure ANOVA detected significant differences. Tukey and Bonferroni *post hoc* tests were used for further analyses. Thus, it was not necessary to check for the assumption of homoscedasticity since this assumption was consistently met. Depending on the distribution, a paired sample t-test or paired sample Wilcoxon test was used for analysis involving incomplete follow-up with OCT.

When statistically significant differences were identified by Friedman test, the Durbin–Conover test was used to compare groups. One-way ANOVA or Kruskal–Wallis one-way ANOVA was used to analyze the differences between the groups over the weeks, depending on distribution. Levene's test for homoscedasticity was used if one-way ANOVA revealed statistically significant differences; a *post hoc* analysis test was used based on its results (i.e., Tukey and Games-Howell for equal variances and different variances). The Dwass–Steel–Critchlow–Fligner test was used to explore the differences between groups revealed by Kruskal–Wallis ANOVA. Pearson's or Spearman's correlation tests regarding IOP and RNFL were used based on data distribution.

Results

hWJ-MSCs quality control

hWJ-MSCs induced the expression (80%) of antibodies such as cluster of differentiation (CD90, CD73, CD105, and CD274, but not CD45, CD34, CD31), and/or human leukocyte antigen - DR isotype (HLA-DR) expression (≥2%); the TCD3+ inhibition capacity was ≤87%. The cells had 99% viability and endotoxin levels of <0.45 EU/mL and lacked mycoplasma and other microorganisms (sterile cellular suspension).

IOP in an early glaucoma model

IOP significantly increased ($p < 0.001$, Kruskal–Wallis ANOVA) in G1 and G3 from week 3 of the study (12.42 ± 1.85 [7.0–21.0] mmHg) compared with that in the control group (11.59 ± 1.89 [7.0–15.0] mmHg). There were no significant differences in control eyes between weeks ($p > 0.05$, Kruskal–Wallis ANOVA). Right eye IOP was 25.22 ± 12.31 (13.0–64.0) mmHg, 13.33 ± 3.32 (7.0–25.0) mmHg, and 19.16 ± 4.47 (11.0–42.0) mmHg in G1, G2, and G3, respectively. After discontinuing GC treatment at week 5, a sudden increase in G1 IOP was observed compared to that for G3 (Supplementary Table-1). All groups had a slightly higher IOP in the afternoon than in the morning. However, this was not statistically significant, indicating that the animals were suitably acclimatized ($p > 0.05$, Kruskal–Wallis ANOVA).

Ophthalmological and retinographic changes and hWJ-MSCs use post-hypertension

A complete ophthalmological examination was performed every day before OH was induced to identify any ophthalmological changes occurring during the development of the proposed experimental model. No alterations in the cornea's curvature or irregularities in the corneal surface were observed with topical anesthesia when the anterior segment was evaluated using a slit-lamp.

No damage to the eyeball adnexal organs or blepharospasm, epiphora, or photophobia, which could indicate pain or discomfort, was observed during the 5 weeks of OH induction in groups G1 and G3. However, one G3 animal suffered intense conjunctival hyperemia, mild corneal edema, rubeosis iridis, and iritis from week 7 of the study after applying hWJ-MSCs. Clinical characteristics changed by week 9 (less conjunctival hyperemia, gray-green iris, and corneal edema). At week 9, one animal in G2 had mydriasis without response to light stimulation. No signs of uveitis or infection were observed after intravitreal application of hWJ-MSCs in the other experimental animals.

Retinography revealed vascular dilatation, tortuosity, and ONH changes, including G1 papillary asymmetry. Vitreous hemorrhage was observed in the same animal in G2, which suffered from mydriasis; no changes were observed in the other animals. No retinal or optic disk abnormalities in the posterior segment were observed in G3 rats compared with those in the G1 rats; however, an MSCs-enriched solution located over the optic nerve was observed in one animal in this group (Figure-1).

Optic nerve OCT

Structural changes in retinal and ONH were observed in weeks 1 and 9 after OH and intravitreal injection of hWJ-MSCs. A decrease in RNFL thickness was observed in G1 at week 9 (40.5 ± 20.3 [25.0–69.0] µm) compared to week 1 (49.4 ± 17.6 [29.0–68.0] µm) and week 4 (58.2 ± 9.7 [48.0–69.0] µm) ($p = 0.159$,

Supplementary Table-1: Measurements of the IOP in different groups on weeks.

IOP	Week 1 Media (SD) (IQR)	Week 2 Media (SD) (IQR)	Week 3 Media (SD) (IQR)	Week 4 Media (SD) (IQR)	Week 5 Media (SD) (IQR)	Week 6 Media (SD) (IQR)	Week 7 Media (SD) (IQR)	Week 8 Media (SD) (IQR)	Week 9 Media (SD) (IQR)
G1	12.8 (2.0) (7.0–19.0)	10.5 (2.5) (8.0–17.0)	14.3 (2.2) (9.0–20.0)	15.1 (2.2) (8.0–21.0)	15.5 (3.3) (8.0–26.0)	22.0 (7.8) (13.0–66.0)	25.2 (12.3) (13.0–64.0)	23.8 (14.4) (11.0–74.0)	18.1 (9.9) (12.0–45.0)
G2	12.3 (1.9) (7.0–17.0)	11.1 (2.4) (7.0–16.0)	10.8 (1.6) (7.0–16.0)	12.0 (1.8) (9.0–17.0)	12.9 (1.6) (9.0–15.0)	12.3 (3.3) (7.0–15.0)	12.7 (2.2) (8.0 15.0)	12.2 (1.1) (8.0–15.0)	11.6 (1.5) (9.0–15.0)
G3	12.2 (2.1) (7.0–19.0)	10.2 (3.1) (8.0–17.0)	14.2 (3.3) (9.0–24.0)	15.3 (3.9) (8.0–30.0)	15.2 (4.0) (8.0–33.0)	18.2 (3.9) (10.0–29.0)	19.2 (4.5) (11.0–42.0)	17.2 (4.3) (7.0–28.0)	13.2 (3.2) (7.0–25.0)

ANOVA one way; *Kruskal-Wallis ANOVA. G1: ocular hypertension, G2: hWJ-MSCs; G3: ocular hypertension + hWJ-MSCs; SD: standard deviation; IQR: interquartile range. IOP: intraocular pressure.

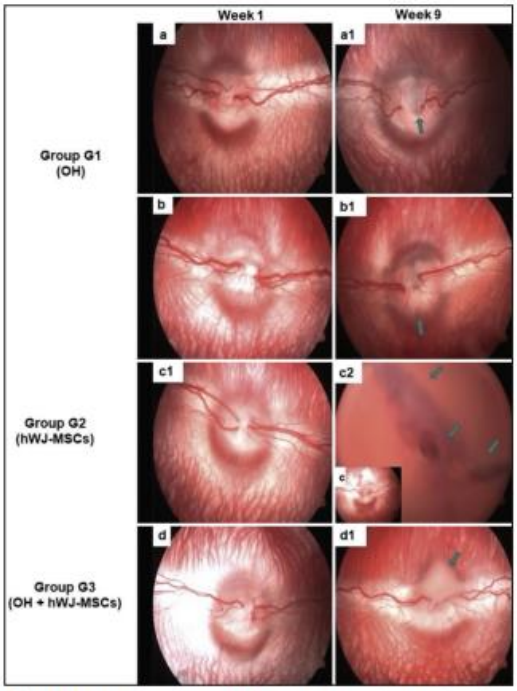


Figure-1: Fundus photographs taken 1 and 9 weeks after inducing ocular hypertension (OH) and intravitreal hWJ-MSCs transplant. The results observed for G1 revealed more significant changes in the optic nerve (a1: Papillary asymmetry suggestive of optic nerve excavation; b1: Irregular hypopigmentation located peripheral to the optic disc margin) compared to G2 (c1: Other animals exhibited no alterations; c2: Vitreous hemorrhage in one animal) and G3 (d1: hWJ-MSCs solution localized on the optic nerve head). a, b, c, d: Eyes week 1. G1 OH, G2 hWJ-MSCs and G3 OH + hWJ-MSCs. hWJ-MSCs=Human Wharton's jelly-derived mesenchymal stromal cells.

Friedman's ANOVA). A decrease in RNFL thickness in G3 was also observed at week 9 (31.4 ± 14.4 [11.0–51.0] µm) compared to weeks 1 (54.2 ± 25.5 [29.0–83.0] µm) and 4 (36.0 ± 12.1 [19.0–53.0] µm) (p = 0.249, Friedman's ANOVA). A decrease in RNFL thickness was observed in G2 when comparing week 1 (60.8 ± 24.2 [32.0–95.0] µm) and week 9 (43.0 ± 18.3 [21.0–60.0] µm, p = 0.393, Wilcoxon test); such a decrease was not significant.

A decrease in G1 was observed by measuring the disk area at week 9 (2.0 ± 0.4 [1.5–2.4] mm^2) compared to weeks 1 (2.9 ± 1.5 [1.4–4.7] mm^2) and 4 (2.7 ± 0.8 [2.2–4.2] mm^2) (p = 0.247, Friedman's ANOVA). A decrease in G3 disk area was also observed at week 9 (3.1 ± 0.4 [2.5–3.6] mm^2) compared with weeks 1 (3.3 ± 0.6 [2.8–4.2] mm^2) and 4 (3.3 ± 0.7 [2.1–3.7] mm^2) (p = 0.802, Friedman's ANOVA). However, an increase in disk area was observed in G2 when comparing weeks 1 (2.8 ± 1.1 [1.8–4.0] mm^2) and 9 (3.0 ± 1.0 [2.0–4.3] mm^2), p = 0.555, Wilcoxon test.

A significant decrease in GCL thickness was observed in G1 at week 9 (8.5 ± 5.2 [3.0–15.0] µm) compared with that at weeks 1 (35.4 ± 14.94 [20.0–58.0] µm) and 4 (21.8 ± 6.1 [16.0–32.0] µm) (p = 0.044, Friedman's ANOVA), but it was not statistically significant in G2 compared with that at weeks 1 (25.4 ± 9.9 [16.0–38.0] µm) and 9 (16.5 ± 12.6 [4.0–32.0] µm p = 0.1, Wilcoxon test. However, an increase in GCL thickness in G3 was observed at week 9 (20.4 ± 9.2 [8.0–31.0] µm) compared to weeks 1 (17.4 ± 12.12 [6.0–37.0] µm) and 4 (16.0 ± 19.4 [2.050.0] µm) (p = 0.249, Friedman's ANOVA). No statistically significant differences in GCL thickness between the groups were observed in the *post hoc* test. Regarding optic cup volume analysis, a significant increase in G1 was observed when comparing weeks 1 and 9 (p = 0.047, Tukey) (Figures-2a and b). This difference was not statistically significant regarding changes in G1 regarding optic cup volume in the *post hoc* analysis (p = 0.052, Scheffe and p = 0.07, Bonferroni). However, reduced optic cup volume was observed between weeks 1 and 9 in G2 (p = 0.502) and G3 (p = 0.445). There was no statistically significant correlation between RNFL and IOP.

Differences regarding RNFL were observed between the G1 and G3 groups and the control group at week 4 when comparing the study groups (Tables-1-3) (p = 0.043, Kruskal–Wallis ANOVA.). Differences were observed between G1 and G3 in *post hoc* analysis (p = 0.049, Tukey) (Table-2). Statistically significant differences were found between groups in week 9 regarding disk area (p = 0.024); statistically significant differences between groups were lost in *post hoc* analysis by Tukey test (Table-3) (p = 0.043, Kruskal–Wallis ANOVA; Tables-1-3). *Post hoc* analysis revealed differences between G1 and G3 (p = 0.049, Tukey) (Table-2). Statistically significant differences in disk area were found between the groups at week 9 (p = 0.024); these differences were lost in *post hoc* analysis by Tukey's test (Table-3).

Discussion

This study has shown that intravitreal hWJ-MSCs transplantation can lead to early detection of changes in ONH by OCT in an experimental model of OH. Structural improvement in optic cup volume was observed in this experimental model. In addition to secreting exosomes, which provide regenerative and restorative effects on the microenvironment [20, 21], MSCs secrete growth factors and cytokines that affect nearby cells.

Contrary to what He *et al*. [22] observed in a monkey model of OH, in a rabbit-based experimental model, the data presented here demonstrated that a detectable change in RNFL preceded the change produced in ONH. Furthermore, intravitreal injection of hWJ-MSCs did not prevent the progression of OH changes in RNFL.

Because glaucoma is an irreversible, progressive optic neuropathy, thinning of the RNFL is expected [23]. Therefore, a decrease in RNFL

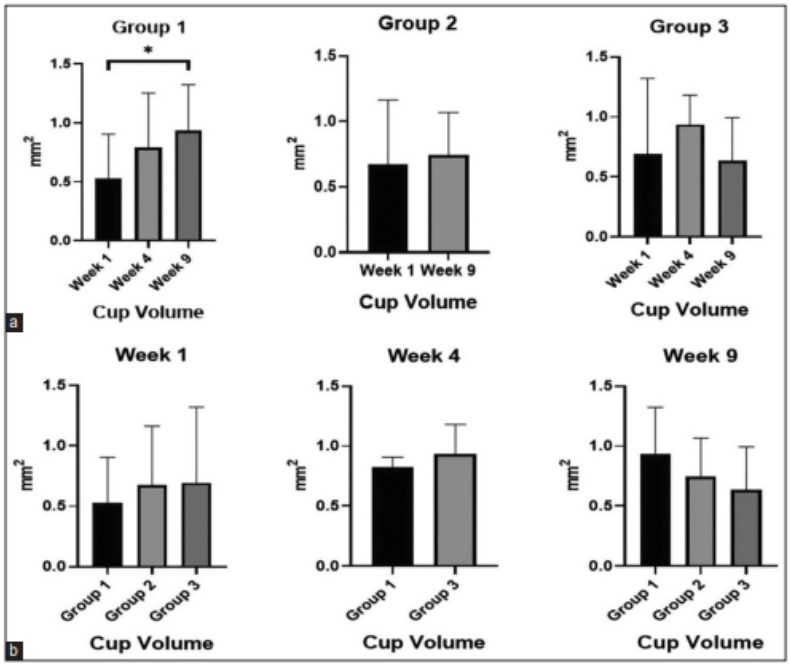


Figure-2: Changes in optic nerve after inducing ocular hypertension (OH) and intravitreal hWJ-MSCs transplant. (a) Analysis of optic cup volume in the groups during the weeks of the study and (b) Comparing the groups' optic cup volume. Repeated measures analysis of variance (ANOVA); *Friedman's ANOVA. $p < 0.05$. G1 OH, G2 hWJ-MSCs and G3 OH + hWJ-MSCs. hWJ-MSCs=Human Wharton's jelly-derived mesenchymal stromal cells.

Table-1: Measurements of the optic nerve head in different groups in week one, performed by Cirrus HD-OCT.

Optic Nerve OCT	G1 Media (SD) (IQR)	G2 Media (SD) (IQR)	G3 Media (SD) (IQR)	p-value
RNFL (μm)	49.4 (17.6) (29.0–68 0.0)	60.8 (24.2) (32.0–95.0)	54.2 (25.5) (29.0–83.0)	0.725
Disk Area (mm²)	2.9 (1.5) (1.4–4.7)	2.8 (1.1) (1.8–4.0)	3.3 (0.6) (2.8–4.2)	0.622
Coup Volume	0.5 (0.4) (0.2–1.0)	0.7 (0.5) (0.2–1.2)	0.7 (0.6) (0.0–1.5)	0.831
Vertical Coup/Disc Ratio	0.8 (0.1) (0.6–0.9)	0.9 (0.1) (0.8–1.0)	0.8 (0.3) (0.3–1.0)	0.277*
GCL (μm)	35.4 (14.9) (20.0–58.0)	25.4 (9.9) (16.0–38.0)	17.4 (12.1) (6.0–37.0)	0.196

ANOVA one way; *Kruskal-Wallis ANOVA. G1: ocular hypertension, G2: hWJ-MSCs; G3: ocular hypertension + hWJ-MSCs; SD: standard deviation; IQR: interquartile range. RNFL: Retinal Nerve Fiber Layer; GCL: Ganglion Cell Layer

Table-2: Measurements of the optic nerve head in different groups in week four, performed by Cirrus HD-OCT.

Optic Nerve OCT	G1 Media (SD) (IQR)	G3 Media (SD) (IQR)	Control Media (SD) (IQR)	p-value
RNFL (μm)	58.2 (9.7) (48.0–69.0)	36.0 (12.1) (19.0–53.0)	45.0 (16.6) (33.0–72.0)	0.043
Disk Area (mm²)	2.7 (0.8) (2.2–4.2)	3.3 (0.7) (2.1–3.7)	3.7 (0.7) (2.7–4.2)	0.136*
Coup Volume	0.8 (0.5) (0.3–1.4)	0.9 (0.2) (0.5–1.1)	0.9 (0.5) (0.2–1.4)	0.826
Vertical Coup/Disc Ratio	0.8 (0.1) (0.7–0.9)	0.9 (0.0) (0.8–0.9)	0.8 (0.0) (0.8–0.9)	0.234
GCL (μm)	21.8 (6.1) (16.0–32.0)	16.0 (19.4) (2.0–50.0)	29.8 (16.5) (10.0–47.0)	0.274*

ANOVA one way; *Kruskal-Wallis ANOVA. G1: ocular hypertension, G3: ocular hypertension + hWJ-MSCs; Controls are mixed of the three groups. SD: standard deviation; IQR: interquartile range. RNFL: Retinal Nerve Fiber Layer; GCL: Ganglion Cell Layer

Table-3: Measurements of the optic nerve head in different groups in week nine, performed by Cirrus HD-OCT.

Optic Nerve OCT	G1 Media (SD) (IQR)	G2 Media (SD) (IQR)	G3 Media (SD) (IQR)	p-value
RNFL (μm)	40.5 (20.3) (25.0–69.0)	43.0 (18.3) (21.0–60.0)	31.4 (14.4) (11.0–51.0)	0.589
Disk Area (mm²)	2.0 (0.4) (1.5–2.4)	3.0 (1.0) (2.0–4.3)	3.1 (0.4) (2.5–3.6)	0.024
Coup Volume	0.9 (0.4) (0.6–1.4)	0.7 (0.3) (0.3–1.1)	0.6 (0.4) (0.1–1.1)	0.553
Vertical Coup/Disc Ratio	0.9 (0.1) (0.8–1.0)	0.8 (0.1) (0.7–1.0)	0.8 (0.2) (0.4–0.9)	0.704
GCL (μm)	8.5 (5.2) (3.0–15.0)	16.5 (12.6) (4.0–32.0)	20.4 (9.2) (8.0–31.0)	0.133

ANOVA one way; *Kruskal-Wallis ANOVA. G1: ocular hypertension, G2: hWJ-MSCs; G3: ocular hypertension + hWJ-MSCs; SD: standard deviation; IQR: interquartile range. RNFL: Retinal Nerve Fiber Layer; GCL: Ganglion Cell Layer

thickness was observed in all study groups when measuring RNFL by OCT, indicating that the intravitreal application of hWJ-MSCs did not affect the RNFL in the OH group. An incidental observation indicated a trend toward a reduction in RNFL thickness in the group that received cell transplants without OH. Although there was a trend toward reducing the thickness, it was not statistically significant. This observation regarding RNFL in this group may have been due to the release of cytokines and inflammatory mediators initially secreted by microglia cells [24] and should, therefore, not be considered innocuous.

Groups receiving cell therapy had decreased optic cup volume and increased optic nerve rim area was detected early by OCT. Such findings may have been associated with the increase in blood flow produced by cell therapy, thereby causing prelaminar tissue thickening and anterior movement of the lamina cribosa, thereby altering some ONH structures [25, 26]. MSCs have a direct effect on angiogenesis by increasing vascular endothelial growth factor and its receptor levels, suggesting that MSCs administration may provide a restorative microenvironment and exert a paracrine neuroprotective effect on RGCs [27].

Other acceptable explanations for such observations include prelaminar glial proliferation and connective tissue synthesis in response to intravitreally applied cell therapy. Although the optic cup volume and IOP decreased in the OH cell therapy group, no significant increase in RNFL thickness was observed. Hence, the explanation for this finding is probably not an increase in the number of axons, but rather a relaxation of the tissues supporting the papillary structures [28, 29] following cell therapy.

A trend toward greater RGC layer thickness and optic disk area maintenance was observed in the OH group transplanted with hWJ-MSCs compared to the group that did not receive these cells. This tendency to delay RGC loss has been described in the relevant literature regarding a rat optic nerve crush model involving intravitreal MSCs transplant [30, 31]. The secretion of anti-inflammatory molecules and trophic factors is one of the *in vivo* characteristics of hWJ-MSCs, which may explain the induced neuroprotection [32].

Degenerated axon regeneration in glaucoma is unlikely to occur in the remodeled cribriform plate [33, 34]. We believe that intravitreal hWJ-MSCs ameliorated the altered environment and promoted cellular neuroprotection in this study. Yang *et al*. [34] suggested that the mechanism underlying the axon regeneration-promoting effect after MSCs transplantation is likely due to cytokine or growth factor release, rather than differentiation into neural or glial cells.

Despite the significant differences found between the OH groups regarding IOP measurements, no significant alterations were observed regarding the various ONH measurements in OCT. Such observation means that IOP reduction was not the only factor conditioning ONH changes; variability concerning ONH changes to IOP reduction could have been due to the small sample size, the technique used or other coexisting modifying factors [35], that is, the use of cell therapy. In addition to the small sample size, which can reduce statistical power, the RGC layer measurement was a concern because the equipment used automatically takes the measurements, thereby not allowing image segmentation; this could have introduced subjective bias. Although OCT provided information regarding early optic nerve changes following cell therapy, histological analysis could be used to correlate *in vivo* OCT scan results with histopathological findings.

This study could help detect early histopathological characteristics of ONH alterations and provide greater security regarding hWJ-MSCs use. Future research should be aimed at correlating our optic nerve findings with RGC assessment using retinal whole mount plans stained with live RGC-specific staining and counting RGCs.

Conclusion

Our study has shown that intravitreally applied cell therapy can produce changes in the ONH in an experimental OH model, aimed at early detection by OCT; however, such cell therapy failed to recover the RNFL in the short term. Therefore, further research into the role of hWJ-MSCs in the cellular microenvironment after transplantation is necessary to increase the understanding of glaucoma pathogenesis and develop new and better treatment approaches.

Authors' Contributions

KSE and AT: Research concept and design and drafted the manuscript. KSE: Collected and assembled data. KSE, CCG, and WRC: Data analysis and interpretation. KSE, AT, CCG, and WRC: Critical revision of the manuscript. KSE, AT, CDVA, GS, MCA, and CRS: Methodology. All authors compiled, read, revised, and approved the final manuscript.

Acknowledgments

The authors are thankful to the Universidad del Rosario (Colombia) and the Higher School of Ophthalmology- Instituto Barraquer de América (Colombia) for financing this study with grant number IV-TFA026.

Competing Interests

The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's Note

Veterinary World remains neutral with regard to jurisdictional claims in published institutional affiliation.

References

1. Arrigo, A., Aragona, E., Saladino, A., Arrigo, D., Fantaguzzi, F., Battaglia Parodi, M. and Bandello, F. (2021) Cognitive dysfunctions in glaucoma: An overview of morpho-functional mechanisms and the impact on higher-order visual function. *Front. Aging Neurosci*., 13: 747050.
2. Faizan, A., Imtiaz, R., Madni, H.A., Khan, H.A., Khan, T.M., Khan, M.A.U. and Naqvi, S.S. (2021) A review on glaucoma disease detection using computerized techniques. *IEEE Access*, 9: 37311–37333.
3. Scott, E.M., Boursiquot, N., Beltran, W.A. and Dubielzig, R.R. (2013) Early histopathologic changes in the retina and optic nerve in canine primary angle-closure glaucoma. *Vet. Ophthalmol*., 16(Suppl 1): 79–86.
4. McLellan, G.J. and Rasmussen, C.A. (2012) Optical coherence tomography for the evaluation of retinal and optic nerve morphology in animal subjects: Practical considerations. *Vet. Ophthalmol*., 15(2): 13–28.
5. Yamauchi, Y., Agawa, T., Tsukahara, R., Kimura, K., Yamakawa, N., Miura, M. and Goto, H. (2011) Correlation between high-resolution optical coherence tomography (OCT) images and histopathology in an iodoacetic acid-induced model of retinal degeneration in rabbits. *Br. J. Ophthalmol*., 95(8): 1157–1160.
6. Hoyng, P.F.J. and van Beek, L.M. (2000) Pharmacological therapy for glaucoma. *Drugs*, 59(3): 411–434.
7. Jacobson, A., Rojas, C. and Bohnsack, B.L. (2021) Ologen augmentation of Ahmed glaucoma drainage devices in pediatric glaucomas. *BMC Ophthalmol*., 21(1): 72.
8. Harrell, C.R., Fellabaum, C., Arsenijevic, A., Markovic, B.S., Djonov, V. and Volarevic, V. (2019) Therapeutic potential of mesenchymal stem cells and their secretome in the treatment of glaucoma. *Stem Cells Int*., 2019: 7869130.
9. Nauta, A.J. and Fibbe, W.E. (2007) Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood*, 110(10): 3499–3506.
10. Vilar, A., Hodgson-Garms, M., Kusuma, G.D., Donderwinkel, I., Carthew, J., Tan, J.L., Lim, R. and Frith, J.E. (2023) Substrate mechanical properties bias MSC paracrine activity and therapeutic potential. *Acta Biomater.*, 168: 144–158.
11. Johnson, T.V., DeKorver, N.W., Levasseur, V.A., Osborne, A., Tassoni, A., Lorber, B., Heller, J.P., Villasmil, R., Bull, N.D., Martin, K.R. and Tomarev, S.I. (2014) Identification of retinal ganglion cell neuroprotection conferred by platelet-derived growth factor through analysis of the mesenchymal stem cell secretome. *Brain*, 137(2): 503–519.
12. Qin, Y., Lam, S., Yam, G.H.F., Choy, K.W., Liu, D.T.L., Chiu, T.Y.H., Li, W.Y., Lam, D.S.C., Pang, C.P. and Fan,D.S.P. (2012) A rabbit model of age-dependant ocular hypertensive response to topical corticosteroids. *Acta Ophthalmol*., 90(6): 559–563.
13. Khan, S.U., Ashraf, M., Salam, A., Ali, Z., Rahman, M.U. and Shah, A. (2014) Steroid induced ocular hypertension: An animal model. *Gomal J. Med. Sci*., 12(2): 115–117.
14. Pereira, F.Q., Bercht, B.S., Soares, M.G., da Mota, M.G.B. and Pigatto, J.A.T. (2011) Comparison of a rebound and an applanation tonometer for measuring intraocular pressure in normal rabbits. *Vet. Ophthalmol*., 14(5): 321–326.
15. Silva-Cote, I., Cruz-Barrera, M., Cañas-Arboleda, M., Correa-Araujo, L., Méndez, L., Jagielska, J., Camacho, B. and Salguero, G. (2019) Strategy for the generation of engineered bone constructs based on umbilical cord mesenchymal stromal cells expanded with human platelet lysate. *Stem Cells Int*., 2019: 7198215.
16. Cañas-Arboleda, M., Beltrán, K., Medina, C., Camacho, B. and Salguero, G. (2020) Human platelet lysate supports efficient expansion and stability of Wharton's Jelly mesenchymal stromal cells via active uptake and release of soluble regenerative factors. *Int. J. Mol. Sci*., 21(17): 6284.
17. Xuqian, W., Kanghua, L., WeiHong, Y., Xi, Y., Rongping, D., Qin, H., Fangtian, D. and Zhao, R.C. (2011) Intraocular transplantation of human adipose-derived mesenchymal stem cells in a rabbit model of experimental retinal holes. *Ophthalmic Res*., 46(4): 199–207.
18. Lavaud, A., Soukup, P., Martin, L., Hartnack, S. and Pot, S. (2020) Spectral domain optical coherence tomography in awake rabbits allows identification of the visual streak, a comparison with histology. *Trans. Vis. Sci. Technol*., 9(5): 13.
19. Soukup, P., Maloca, P., Altmann, B., Festag, M., Atzpodien, E.A. and Pot, S. (2019) Interspecies variation of outer retina and choriocapillaris imaged with optical coherence tomography. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*., 60(10): 3332–3342.
20. Tuekprakhon, A., Sangkitporn, S., Trinavarat, A., Pawestri, A.R., Vamvanij, V., Ruangchainikom, M., Luksanapruksa, P., Pongpaksupasin, P., Khorchai, A., Dambua, A., Boonchu, P., Yodtup, C., Uiprasertkul, M., Sangkitporn, S. and Atchaneeyasakul, L. (2021) Intravitreal autologous mesenchymal stem cell transplantation: A non-randomized phase I clinical trial in patients with retinitis pigmentosa. *Stem Cell Res. Ther*., 12(1): 52.
21. Foo, J.B., Looi, Q.H., Chong, P.P., Hassan, N.H., Yeo, G.E.C., Ng, C.Y., Koh, B., How, C.W., Lee, S.H. and Law, J.X. (2021) Comparing the therapeutic potential of stem cells and their secretory products in regenerative medicine. *Stem Cells Int.*, 2021: 2616807.
22. He L, Yang H, Gardiner SK, Williams G, Hardin C, Strouthidis NG, Fortune B, Burgoyne CF. (2014) Longitudinal detection of optic nerve head changes by spectral domain optical coherence tomography in early experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*., 29;55(1):574-86.
23. Elsawy, A.F., Fayek, H.M. and Mahmoud, E.A. (2020) Glaucoma diagnostic accuracy of ganglion cell inner plexiform layer thickness comparison with peripapillary retinal nerve fiber layer. *Benha J. Appl. Sci*., 5(5): 273–278.
24. Taylor, A.W. (2009) Ocular immune privilege. *Eye* (*Lond*), 23(10): 1885–1889.
25. Mursch-Edlmayr, A.S., Bolz, M. and Strohmaier, C. (2021) Vascular aspects in glaucoma: From pathogenesis to therapeutic approaches. *Int. J. Mol. Sci*., 22(9): 4662.
26. Mackenzie, P.J. and Cioffi, G.A. (2008) Vascular anatomy of the optic nerve head. *Can. J. Ophthalmol*., 43(3): 308–312.
27. Dharmasaroja, P. (2009) Bone marrow-derived mesenchymal stem cells for the treatment of ischemic stroke. *J. Clin. Neurosci*., 16(1): 12–20.
28. Lesk, M.R., Spaeth, G.L., Azuara-Blanco, A., Araujo, S.V., Katz, L.J., Terebuh, A.K., Wilson, R.P., Moster, M.R. and Schmidt, C.M. (1999) Reversal of optic disc cupping after glaucoma surgery analyzed with a scanning laser tomograph. *Ophthalmology*, 106(5): 1013–1018.
29. Waisbourd, M., Ahmed, O.M., Molineaux, J., Gonzalez, A., Spaeth, G.L. and Katz, L.J. (2016) Reversible structural and functional changes after intraocular pressure reduction in patients with glaucoma. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol*., 254(6): 1159–1166.
30. Millán-Rivero, J.E., Nadal-Nicolás, F.M., García-Bernal, D., Sobrado-Calvo, P., Blanquer, M., Moraleda, J.M., Vidal-Sanz, M. and Agudo-Barriuso, M. (2018) Human Wharton's jelly mesenchymal stem cells protect axotomized rat retinal ganglion cells via secretion of anti-inflammatory and neurotrophic factors. *Sci. Rep*., 8(1): 16299.
31. Mead, B. and Tomarev, S. (2017) Bone marrow-derived mesenchymal stem cells-derived exosomes promote survival of retinal ganglion cells through miRNA-dependent mechanisms. *Stem Cells Transl. Med*., 6(4): 1273–1285.
32. Wang, A.Y.L., Loh, C.Y.Y., Shen, H.H., Hsieh, S.Y., Wang, I.K., Lee, C.M. and Lin, C.H. (2020) Human Wharton's jelly mesenchymal stem cell-mediated sciatic nerve recovery is associated with the upregulation of

regulatory T cells. *Int. J Mol. Sci*., 21(17): 6310.
33. Tamm, E.R. and Ethier, C.R. (2017) Biological aspects of axonal damage in glaucoma: A brief review. *Exp. Eye Res*., 157: 5–12.
34. Yang, C.C., Shih, Y.H., Ko, M.H., Hsu, S.Y., Cheng, H. and Fu, Y.S. (2008) Transplantation of human umbilical mesenchymal stem cells from Wharton's Jelly after complete transection of the rat spinal cord. *PLoS One*, 3(10): e3336.
35. Park, H.Y.L., Shin, H.Y., Jung, K.I. and Park, C.K. (2014) Changes in the lamina and prelamina after intraocular pressure reduction in patients with primary open-angle glaucoma and acute primary angle-closure. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*., 55(1): 233–239.

****

CONCLUSIONES:

Al medir el grosor de la capa de fibras nerviosas de la retina (CFNR): Se observó una reducción no significativa en el grosor de la CFNR en todos los grupos del estudio, lo cual sugiere posibles daños en las fibras nerviosas retinianas, asociados comúnmente con condiciones como el glaucoma. Estas alteraciones se manifestaron en las imágenes de OCT como áreas de adelgazamiento en el mapa de espesor retiniano, lo que indica una posible pérdida de tejido en la CFNR. Sin embargo, se detectó un aumento en el grosor de la CFNR en el grupo G1 en comparación con el grupo G3, lo que podría reflejar la presencia de edema o inflamación en el grupo G1. Se requieren más investigaciones para confirmar este hallazgo.

Con relación al volumen de la copa óptica: Se evidenció un incremento significativo en el volumen de la copa óptica en el grupo G1, lo cual es indicativo de un deterioro del nervio óptico y progresión de la enfermedad. En contraste, el grupo G3 mostró una reducción no significativa en el volumen de la copa óptica, lo que sugiere un posible efecto beneficioso de la terapia celular. El grupo G2 no presentó cambios significativos en este parámetro.

Al evaluar el grosor de la capa de células ganglionares (CCGRs): En el grupo G1 se observó una marcada reducción en el grosor de la CCGRs, lo que sugiere degeneración neuronal asociada al desarrollo del glaucoma. En el grupo G2 no se detectaron cambios significativos, lo que podría indicar estabilidad en el grosor de esta capa a lo largo del tiempo. Tras el trasplante intravítreo de WJ-MSCs en el grupo G3, se registró un aumento progresivo en el grosor de la CCGRs, lo que podría implicar un efecto beneficioso de la terapia celular en la preservación o regeneración de las células ganglionares de la retina, representando un avance significativo en el tratamiento del glaucoma.

Al evaluar el área del disco: Se observó una reducción en el tamaño del área del disco óptico en los grupos G1 y G3, sugiriendo una posible pérdida de fibras nerviosas asociada al daño glaucomatoso. Sin embargo, se registró un aumento significativo en el área del disco al comparar los grupos G1 y G3, posiblemente debido al incremento de la PIO. Este hallazgo resalta la importancia de evaluar tanto la morfología del disco óptico como la PIO en el contexto del glaucoma, ya que ambos factores pueden influir en la progresión y gravedad de la enfermedad.

- ***Histología***

Para analizar los cambios morfológicos producidos en el modelo de HO y el efecto del trasplante intravítreo de WJ-MSCs sobre el segmento posterior del ojo, se empleó la técnica de histología. El procesamiento de las muestras de tejido se realizó sin inconvenientes en nuestro estudio. El estudio histopatológico se llevó a cabo en 30 ojos (15 ojos experimentales y 15 ojos control). Antes del procesamiento de las muestras, se establecieron criterios específicos para la clasificación de las estructuras a evaluar (ver tabla 8). Se estudiaron los cambios en la retina y el nervio óptico, evaluando: a) Muerte de células ganglionares de la retina (CGRs), vacuolización de la capa de células ganglionares de la retina (CCGRs), hipertrofia de CGRs; b) Vacuolas intracitoplasmáticas en la capa nuclear interna (CNI), hipertrofia y grosor de la CNI; c) Gliosis en el nervio óptico; y d) Neovascularización (ver figura 46). Basándose en estos resultados, se utilizó un sistema de puntuación histológica para evaluar la repetibilidad y severidad de las lesiones en la retina y el nervio óptico. Los criterios de puntuación histológica de lesiones en retina y nervio óptico fueron: (0) Normal; (1) Leve: < 24% afectado; (2) Moderado: 25% a 50%; y (3) Severo: ≥ 51%.

Tabla 8: Criterios utilizados para la definición de cambios histológicos en retina y nervio óptico.

Células Ganglionares de la Retina	Definición
Muerte	Presencia de células con picnosis, cariolisis, cariorexis
Vacuolización	Presencia de vacuolas intracitoplasmáticas
Hipertrofia	Presencia de células con aumento de tamaño
Gliosis del Nervio Óptico	Infiltrado linfocítico en nervio óptico
Neovascularización	Proliferación de vasos sanguíneos alrededor del nervio óptico y en la superficie de la capa de células ganglionares o en la capa externa en los fotorreceptores

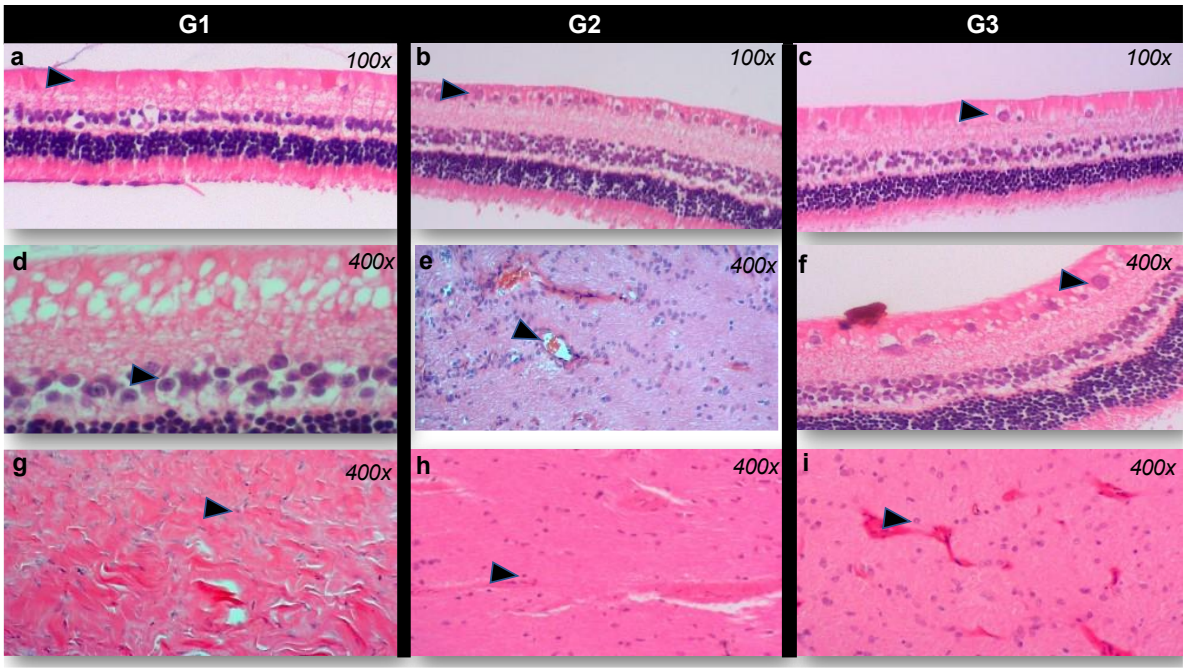


Figura 46: Análisis de histología *post* inducción de HO y trasplante intravítreo de WJ-MSCs demostrando algunas de las alteraciones encontradas. a) Flecha demostrando ausencia de CGRs en CCGRs caracterizada por muerte celular (cariolisis) en G1; b/c) Presencia de CGRs en CCGR en G2 y G3; d) Flecha: CNI, vacuolas intracitoplasmáticas en G1; e) Flecha: proliferación de vasos sanguíneos en el nervio óptico en G2; f) Flecha: hipertrofia de las CGRs en G3 y g/h/i) Flecha: intenso infiltrado del nervio óptico en los grupos de HO. Tinción de hematoxilina eosina. **CCGRs**: capa de células ganglionares. **CGRs**: células ganglionares de la retina. **CNI**: capa nuclear interna. **G1**: HO, **G2**: WJ-MSCs y **G3**: HO + WJ-MSCs. **Fuente**: *Archivo personal*

Se realizaron cortes histológicos de la MT en los grupos con HO con el objetivo de evaluar si el modelo propuesto provocaba cambios estructurales similares a los observados en el glaucoma inducido por GCs. En los cortes histológicos de la MT, se observó fibrosis y estrechamiento del ángulo iridocorneal (ver figura 47 A y B). En contraste, los ojos de control (ver figura 47 C) mostraron un patrón regular en la región de la MT y un ángulo iridocorneal normal.

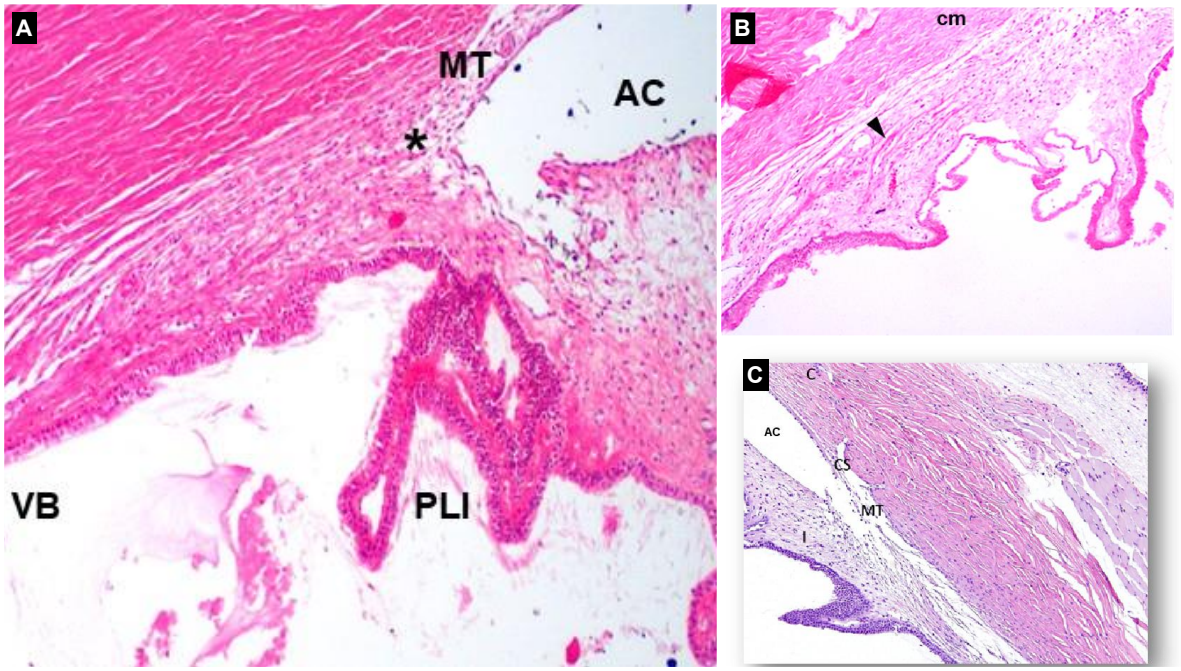


Figura 47: Efecto del uso de glucocorticoides tópicos y subconjuntivales en la estructura del ángulo iridocorneal en ojos de conejos. A) Malla Trabecular (*) comprimida; **B)** Fibrosis (puntas de flecha) y **C)** Estructura normal. **VB**: base vítrea. **MT**: Malla trabecular. **PLI**: pars plicata. **AC:** cámara anterior. Tinción de hematoxilina eosina. **Fuente**: *Archivo personal*

Después de corroborar el modelo experimental de HO, se evaluó el segmento posterior, donde se evidenciaron cambios estructurales en la retina y el nervio óptico en todos los grupos estudiados. En la capa de CCGRs, con relación al análisis de muerte celular, se observó una disminución de las CGRs en 23 de 30 ojos estudiados (<24% de alteración, clasificación 1). Sin embargo, 6 de 30 ojos presentaron un aumento significativo en la muerte de CGRs (>51% de alteración, clasificado como severo), distribuidos en un 80% en G1, 20% en G2 y 20% en G3 (P=0.53). No se observó diferencia significativa al comparar los grupos con los ojos control (ver figura 48).

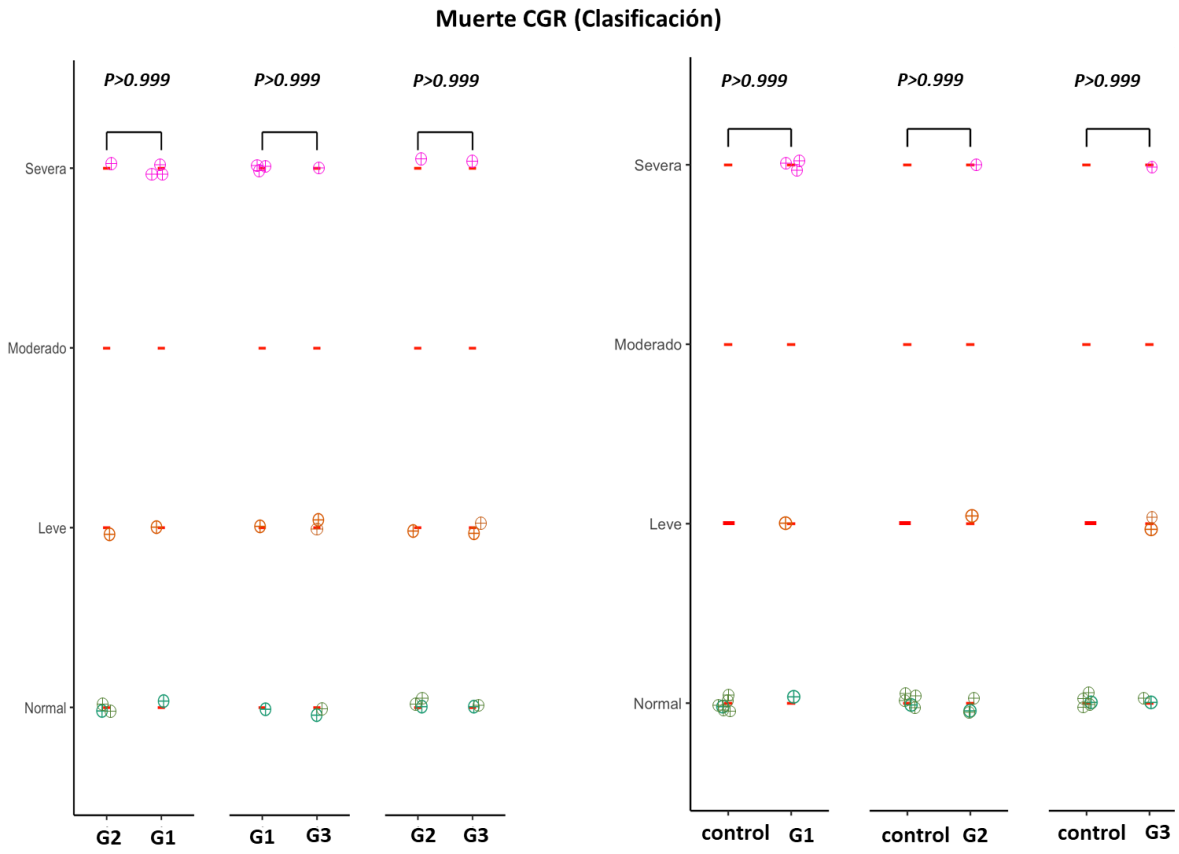


Figura 48: Clasificación histológica de la muerte de CGRs después de la inducción de HO y trasplante intravítreo de WJ-MSCs. Gráficas muestran diferencia no significativa entre grupos. Prueba estadística: prueba de Wilcoxon, valores significativos: *P*≤0.05. **G1**: HO, **G2**: WJ-MSCs y **G3**: HO + WJ-MSCs. **OD:** experimental; **OI**: control

Se observó una formación moderada de vacuolas intracitoplasmáticas en la CCGRs en un 60% en G3 y un 80% en G2. En G1, la formación de vacuolas fue mayor (moderada a severa), aunque no significativa al comparar los grupos (P=0.487). Tampoco se observaron diferencias significativas al comparar los grupos con los ojos control (ver figura 49).

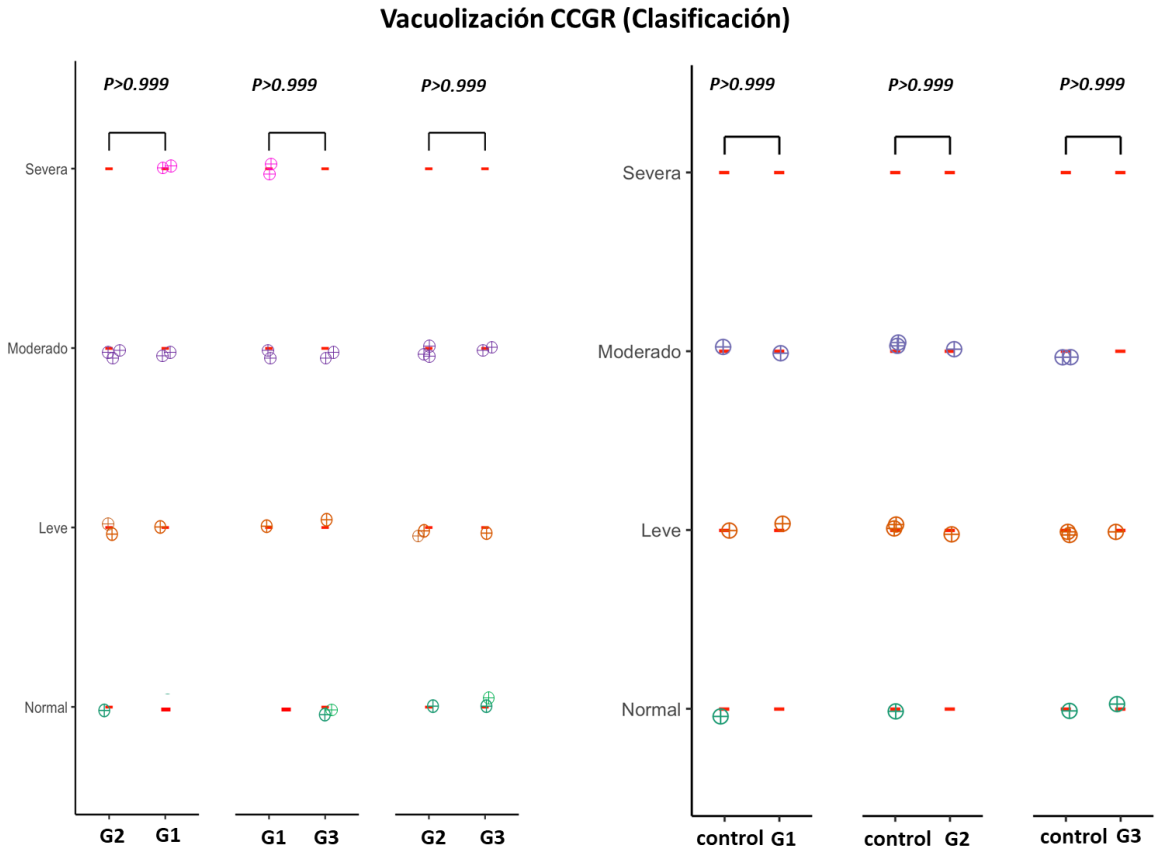


Figura 49: Clasificación histológica de la vacuolización en la CCGRs después de la inducción de HO y trasplante intravítreo de WJ-MSCs. Gráficas muestran diferencia no significativa entre grupos. Prueba estadística: prueba de Wilcoxon, valores significativos: *P*≤0.05. **G1**: HO, **G2**: WJ-MSCs y **G3**: HO + WJ-MSCs. **OD:** experimental; **OI**: control.

En cuanto a la hipertrofia de las CGRs, se observó que el 60% de las células en G3 presentaban hipertrofia moderada. En G1 y G2, un 40% y un 20% respectivamente, presentaron hipertrofia moderada, y un 20% adicional en ambos grupos presentó hipertrofia severa, sin diferencias significativas entre los grupos (P=0.59). Tampoco se encontraron diferencias significativas en comparación con los ojos control (ver figura 50).

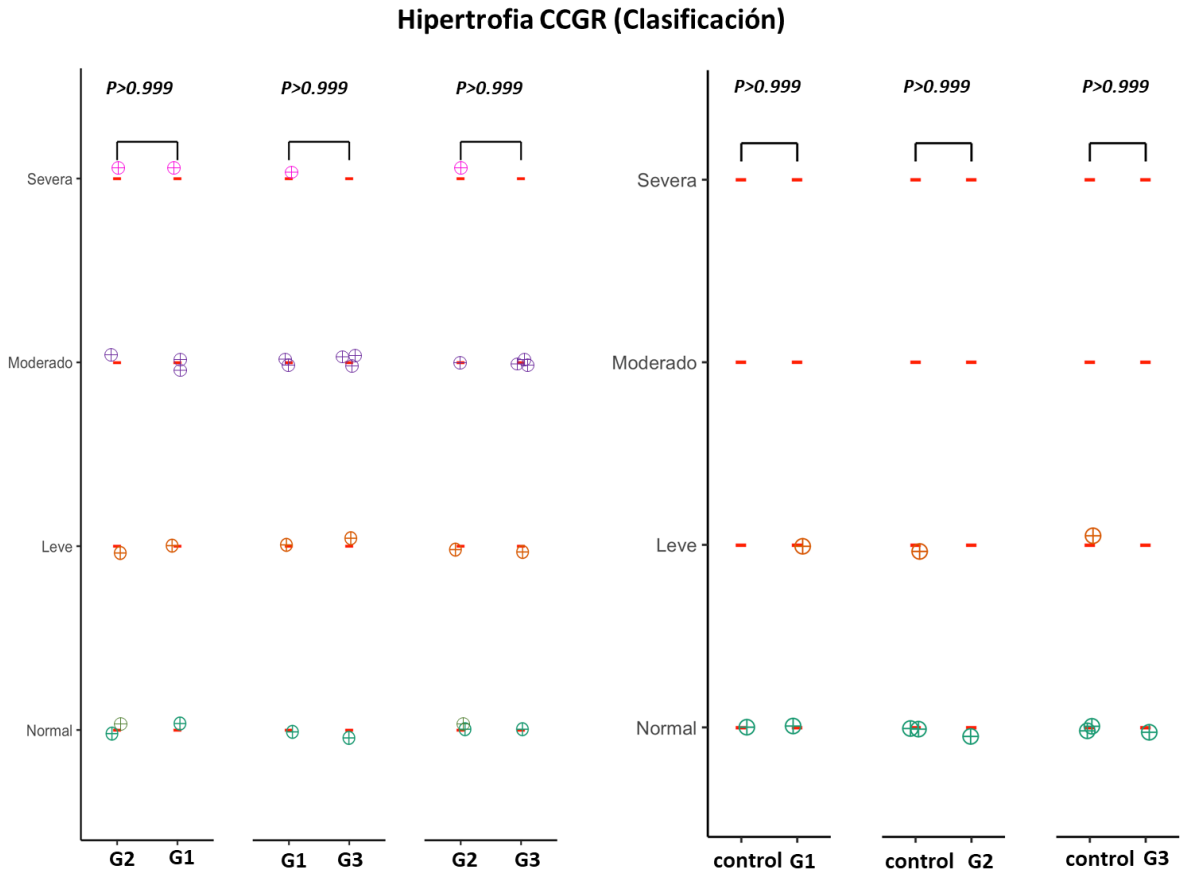


Figura 50: Clasificación histológica de hipertrofia en la CCGRs después de la inducción de HO y trasplante intravítreo de WJ-MSCs. Gráficas muestran diferencia no significativa entre grupos. Prueba estadística: prueba de Wilcoxon, valores significativos: *P*≤0.05. **G1**: HO, **G2**: WJ-MSCs y **G3**: HO + WJ-MSCs. **OD:** experimental; **OI**: control.

En la capa nuclear interna (CNI), el 100% de G3 presentó una ligera formación de vacuolas (clasificación 1). Sin embargo, un 20% en G1 y G2 presentaron formación de vacuolas severa, aunque sin diferencias significativas entre los grupos (P=0.72) (ver figura 51). Solo G1 mostró una leve hipertrofia (clasificación 1) en esta capa de la retina, sin diferencias significativas en comparación con los ojos control (ver figura 52).

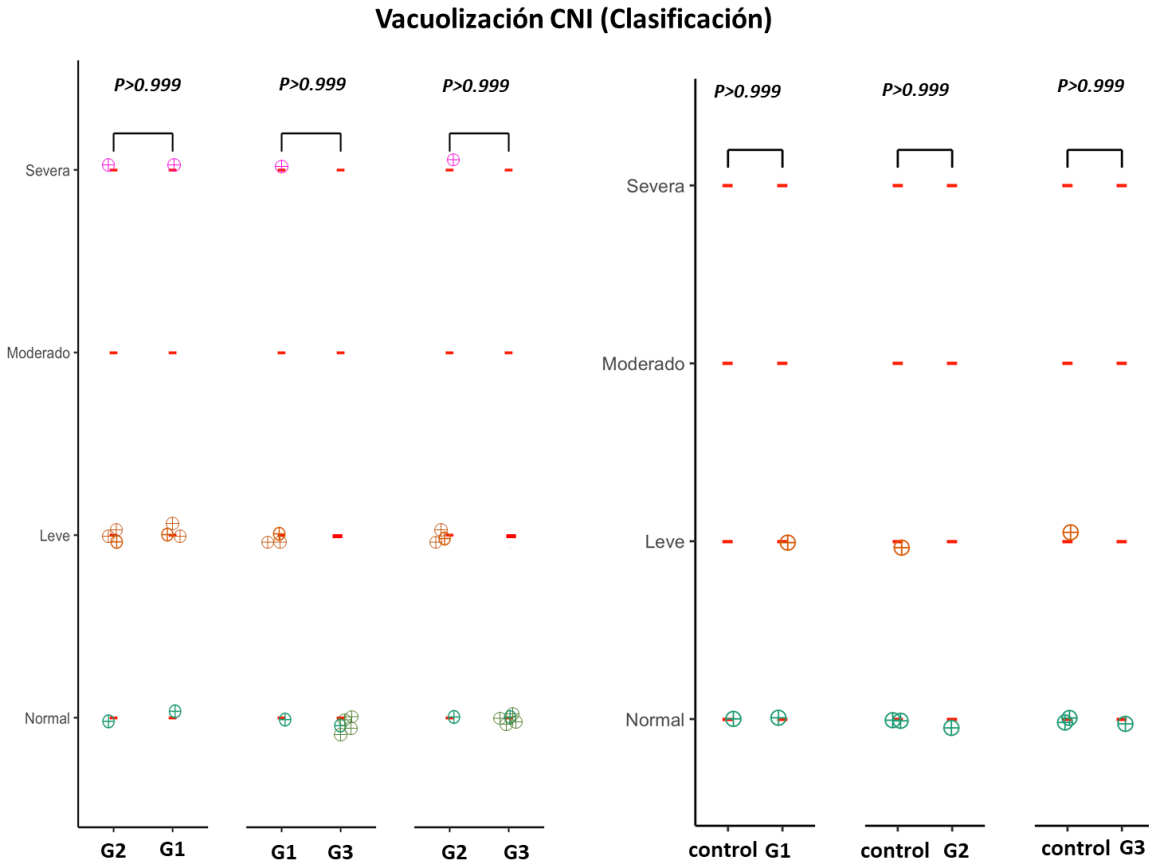


Figura 51: Clasificación histológica de vacuolización en la CNI después de la inducción de HO y trasplante intravítreo de WJ-MSCs. Gráficas muestran diferencia no significativa entre grupos. Prueba estadística: prueba de Wilcoxon, valores significativos: *P*≤0.05. **G1**: HO, **G2**: WJ-MSCs y **G3**: HO + WJ-MSCs. **OD:** experimental; **OI**: control

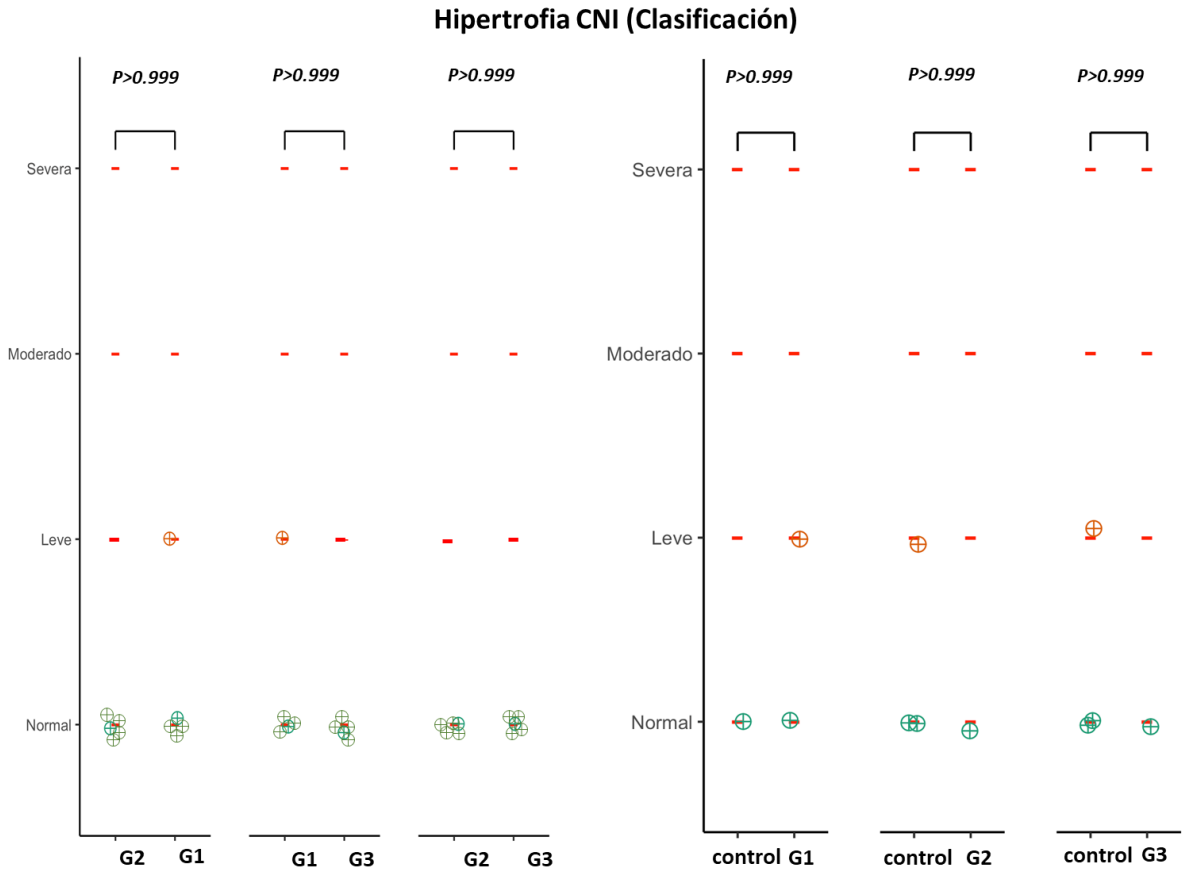


Figura 52: Clasificación histológica de hipertrofia en la CNI después de la inducción de HO y trasplante intravítreo de WJ-MSCs. Gráficas muestran diferencia no significativa entre grupos. Prueba estadística: prueba de Wilcoxon, valores significativos: *P*≤0.05. **G1**: HO, **G2**: WJ-MSCs y **G3**: HO + WJ-MSCs. **OD:** experimental; **OI**: control

Al evaluar el grosor de la CNI, se observó que G3 presentaba un grosor menor en esta capa de la retina (38.3 ± 8.66 µm) en comparación con G1 y G2 (44.7 ± 11.1 µm y 49.1 ± 11.5 µm, respectivamente). Sin embargo, esta reducción no fue estadísticamente significativa (P=0.08) (ver figura 53). Al comparar con los ojos controles, no se encontró una diferencia significativa en los grupos estudiados (G1: 43.05 ± 9.1 µm; G2: 43.85 ± 9.7 µm; G3: 37.60 ± 5.9 µm, P>0.05). No obstante, G2 mostró un mayor grosor en la CNI en comparación con G1, siendo esta diferencia estadísticamente significativa (P=0.04).

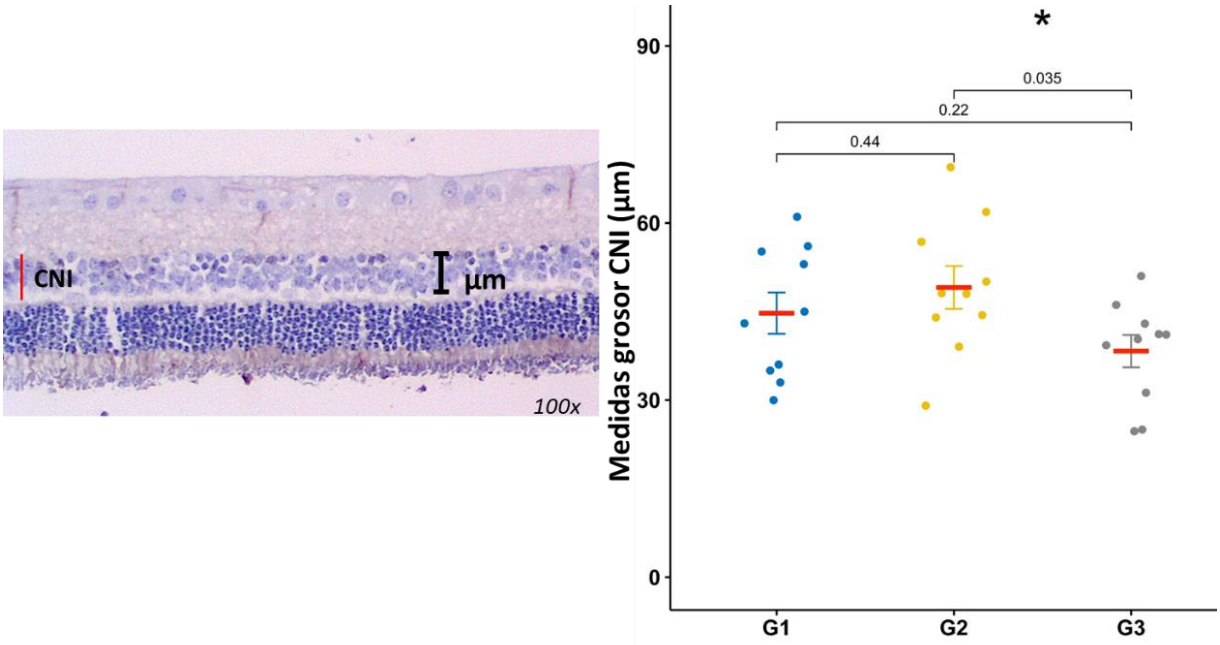


Figura 53: Análisis de histología post inducción de HO y trasplante intravítreo de WJ-MSCs. Medidas del grosor de la CNI y gráficas muestran diferencia significativa entre grupos. Prueba estadística: prueba de Wilcoxon, valores significativos: *P*≤0.05. Tinción de hematoxilina eosina. **CNI**: capa nuclear interna. **G1**: HO, **G2**: WJ-MSCs y **G3**: HO + WJ-MSCs. **OD:** experimental; **OI**: control

En el nervio óptico, se observó un infiltrado linfocitario moderado en un 40% en G1, 20% en G2 y 60% en G3, sin diferencias significativas entre los grupos (P>0.05) (ver figura 54). Además, se detectó neovascularización clasificada como moderada en el 100% de G2, 80% de G3 y 60% de G1, mientras que un 20% de G1 presentó neovascularización severa. Sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas al comparar entre los grupos (P=0.725). Tampoco se observaron diferencias significativas al comparar los grupos con los ojos controles (ver figura 55).

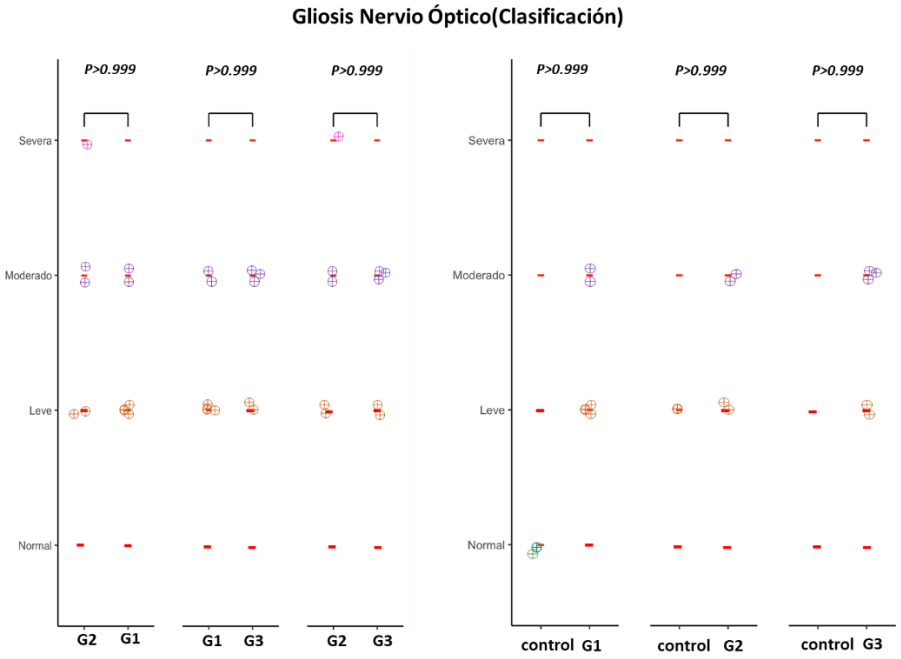


Figura 54: Clasificación histológica de gliosis en el nervio óptico después de la inducción de HO y trasplante intravítreo de WJ-MSCs. Gráficas muestran diferencia no significativa entre grupos. Prueba estadística: prueba de Wilcoxon, valores significativos: *P*≤0.05. **G1**: HO, **G2**: WJ-MSCs y **G3**: HO + WJ-MSCs. **OD:** experimental; **OI**: control

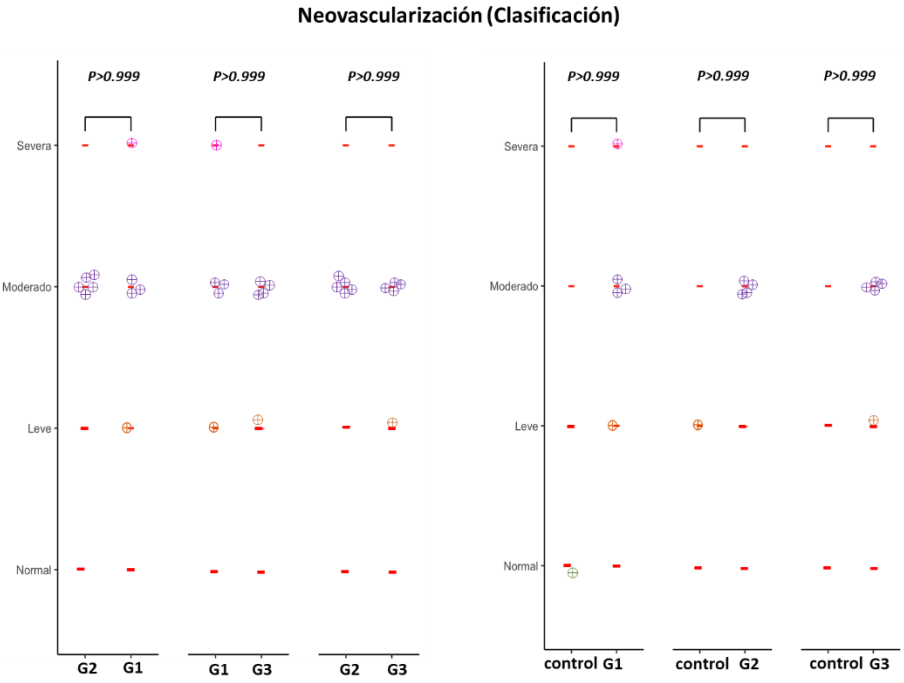


Figura 55: Clasificación histológica de neovascularización en retina y nervio óptico después de la inducción de HO y trasplante intravítreo de WJ-MSCs. Gráficas muestran diferencia no significativa entre grupos. Prueba estadística: prueba de Wilcoxon, valores significativos: *P*≤0.05. **G1**: HO, **G2**: WJ-MSCs y **G3**: HO + WJ-MSCs. **OD:** experimental; **OI**: control

- Cambios Funcionales

ANEXO 3: Respuesta Pupilar Fotocromática y flash-PEV

❖ INTRODUCCIÓN

Esta parte del estudio tenía como finalidad evaluar el uso de la prueba de RPF *y flash-PEV* en la detección temprana del deterioro funcional de las células ganglionares de la retina en todos los grupos del estudio antes y después de la inducción de HO y trasplante de WJ-MSCs. En el contexto del glaucoma, donde la PIO elevada daña progresivamente las estructuras oculares, incluidas las células ganglionares de la retina, la prueba de RPF es útil para evaluar la integridad de las vías visuales (365). Con esta prueba, es posible identificar cambios tempranos en la función visual que podrían indicar la necesidad de ajustar el tratamiento o considerar otras opciones terapéuticas (366), como el uso de células madre propuesto en este estudio. Además, la RPF puede servir como un marcador objetivo para evaluar la eficacia de los medicamentos en la reducción de la PIO y en la protección de las células ganglionares de la retina, guiando así el manejo clínico y terapéutico del glaucoma (367).

En esta investigación, la prueba de RPF consistió en dirigir una fuente de luz azul (465 nm) y roja (640 nm) de alta intensidad hacia los ojos de los animales, con un intervalo de 10 minutos entre las pruebas, en las semanas 1, 3, 6 y 9. Las variables observadas fueron la contracción pupilar, clasificada como "ojo con respuesta" (capacidad visual), y la falta de contracción pupilar, clasificada como "ojo sin respuesta" (ceguera), analizadas mediante las medidas del diámetro pupilar.

Otra técnica empleada para evaluar la función de la retina fue el flash-PEV. En pacientes con glaucoma, esta técnica es crucial para detectar cambios tempranos en la transmisión de señales visuales al cerebro, desempeñando un papel importante en el diagnóstico precoz y el seguimiento de la progresión de la enfermedad (91). Para garantizar la fiabilidad y validez de esta técnica, se llevaron a cabo mediciones preliminares en cinco animales antes de iniciar la fase experimental. Estas mediciones iniciales aseguraron la consistencia y precisión de los resultados durante toda la investigación, fortaleciendo la validez de los hallazgos y la interpretación de los datos recopilados.

Artículo III.

Pakistan Veterinary Journal

ISSN: 0253-8318 (PRINT), 2074-7764 (ONLINE)
DOI: 10.29261/pakvetj/2024.132

RESEARCH ARTICLE

Early Detection of Functional Changes in an Intraocular Hypertension Rabbit Model Treated with Human Wharton Jelly Mesenchymal Stem Cells (hWJ-MSCs) Using Chromatic Pupillometry

Karine dos Santos Evangelho[1], Carlos Cifuentes-González[2], William Rojas-Carabali[2], Clemencia De Vivero-Arciniegas[3], Carlos Téllez-Conti[3], Mariana Cañas-Arboleda[4], Gustavo Salguero[4], Carolina Ramírez-Santana[5] and Alejandra de-la-Torre[2*]

[1]Doctoral Program Biomedical and Biological Sciences, School of Medicine and Health Sciences, Universidad del Rosario, 11121, Bogotá, Colombia
[2]Neuroscience (NEUROS) Research Group, Neurovitae Center for Neuroscience, Institute of Translational Medicine (IMT), Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia
[3]Escuela Superior de Oftalmología del *Instituto* Barraquer de América, 11121, Bogotá, Colombia
[4]Advanced Therapies Unit, Instituto Distrital de Ciencia Biotecnología e Innovación en Salud—IDCBIS, 111611 Bogotá, Colombia
[5]Center for Autoimmune Diseases Research (CREA), Institute of Translational Medicine (IMT), School of Medicine and Health Sciences, Universidad del Rosario, Bogotá, 11121, Colombia
*Corresponding author: alejadelatorre@yahoo.com

ARTICLE HISTORY (23-240)

Received: June 14, 2023
Revised: December 6, 2023
Accepted: December 8, 2023
Published online: February 10, 2024

Key words:
Ocular hypertension
Mesenchymal stromal cells
Chromatic pupillary light reflex
Visual evoked potentials
Early detection.

ABSTRACT

The present study was designed to evaluate the use of a chromatic pupillometry test for the early detection of functional impairment in intrinsically photosensitive retinal ganglion cells (ipRGCs) in an experimental glucocorticoid model of ocular hypertension (OH) treated with intravitreal injection of human Wharton's jelly derived mesenchymal stromal cells (hWJ-MSCs). For this purpose, fifteen New Zealand rabbits were randomly assigned to three groups: OH (G1), hWJ-MSCs (G2), and OH + hWJ-MSCs (G3). The chromatic pupillary light reflex (cPLR) was assessed after dark adaptation to high-illuminance red and blue light stimuli. Response to blue light was used as a marker of ipRGC activity. Amplitude and latency were evaluated using flash-visual evoked potentials (VEP). Intraocular pressure (IOP) (mmHg) was monitored over time. The results indicated a significant increase ($P<0.001$) in the IOP by third week. Pupil diameter (mm) for blue light significantly increased ($P<0.05$) in all groups compared to the control eyes. However, the pupillary diameter in G3 tended to remain constant. Red light elicited significant differences in the responses in G1 ($P=0.025$) and G2 ($P=0.007$). Moreover, we found no correlation between the parameters of blue light intensity and flash-VEP ($P>0.05$). A non-significant increase in the latency of G2 ($P=0.437$) and G3 ($P=0.779$), and a slight increase in the amplitude of G3 were observed ($P=0.268$). The changes generated by the OH can be recognized early through quantitative measurements of the pupillary function. We found that intravitreal injection of human hWJ-MSCs appears to influence ipRGC activity, detectable early through cPLR in eyes with OH. In summary, our study indicates that intravitreal injection of human hWJ-MSCs appears to influence ipRGC activity facilitating the early detection capabilities for ocular hypertension-related changes through cPLR in eyes with OH.

To Cite This Article: Evangelho KDS, Cifuentes-González C, Rojas-Carabali W, Vivero-Arciniegas CD, Téllez-Conti C, Cañas-Arboleda M, Salguero G, Ramírez-Santana C and de-la-Torre A, 2024. Early detection of functional changes in an intraocular hypertension rabbit model treated with human wharton jelly mesenchymal stem cells (hWJ-MSCs) using chromatic pupillometry. Pak Vet J, 44(1): 29-37. http://dx.doi.org/10.29261/pakvetj/2024.132

INTRODUCTION

Glaucoma, characterized by a loss of the retinal ganglion cells (RGCs) and alterations in the optic nerve, leads to visual impairment (Arrigo *et al*., 2021). Early detection and treatment of glaucoma are crucial to halt disease progression (Arévalo-López *et al*., 2023) prompting exploration into neuroprotective therapies to impede the rapid, irreversible cascade of events culminating in blindness (Scott *et al*., 2013). The chromatic

pupillary response has been considered a potentially sensitive disease biomarker diminishes with damage to intact melanopsin-dependent intrinsically photosensitive retinal ganglion cells (ipRGCs) (Rukmini *et al.*, 2019). Notably, its advantages include ease of application, portability, and cost-effectiveness (Suo *et al.*, 2020). In veterinary medicine, the chromatic pupillary response aids in diagnosing sudden acquired retinal degeneration syndrome (Graham *et al.*, 2020) and optic nerve diseases (Terakado *et al.*, 2013).

However, there is compelling evidence demonstrating the potential for functional restoration in retinal ganglion cells (RGCs) and various neural cell types in several blinding diseases (De Silva *et al.*, 2017; Tang *et al.*, 2018), rendering neuroprotective therapies highly promising.

Mesenchymal stem cells (MSCs) have recently emerged as a promising candidate for treating retinal diseases, including glaucoma (Adak *et al.*, 2021; Vilela *et al.*, 2021). The potential application of MSCs as a neuroprotective therapy for glaucoma stems from their multipotent self-replication, low immunogenicity, ease of isolation and their expansion (Nauta and Fibbe, 2007), and notable paracrine properties (Mead *et al.*, 2016). Cells derived from human Wharton jelly (hWJ), in particular, exhibit higher expression of neurotrophic factors and a spontaneous trend toward neural lineage differentiation compared to other MSC sources (Drela *et al.*, 2016). In this context, hWJ-MSCs have demonstrated electrophysiological properties consistent with mature neurons, similar to observations in bone marrow-derived MSCs (Wislet-Gendebien *et al.*, 2005) suggesting their potential to ameliorate optic nerve damage caused by ocular hypertension (OH) (Johnson *et al.*, 2010).

To detect early damage and functional loss in retinal ganglion cells (RGCs) associated with glaucoma, a widely used technique is visual evoked potentials (VEP). Flash-VEP is a practical and effective diagnostic method that reveals the activity of the visual system at the occipital visual cortex level. The responses obtained from the visual stimulus are represented in a waveform. Measurement of wave latency (the time taken for the signal to travel from the retina to the visual cortex) and amplitude (the indicative of the number of retinal ganglion cells working to activate an electrical signal) are employed to evaluate flash-VEP (Tai, 2018).

Our study aimed to assess the early changes generated by OH in the intrinsically photosensitive retinal ganglion cells (ipRGCs) using Flash-VEP and chromatic pupil light reflex (cPLR), as well as to investigate the impact of hWJ-MSCs therapy on retinal and optic nerve function.

MATERIALS AND METHODS

Animals: All experimental and animal care procedures were conducted in accordance with the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research and approved by the Animal Ethics Committee (reference C-20190226-1). The study included 15 New Zealand White (NZW) male rabbits aged approximately 4r months and weighing 2–3 kgs. The animals were housed in a controlled environment with 50±20% relative humidity, room temperature of 15-23ºC and 12-hours light / 12-hours darkness cycle. All animals were caged individually and received a standard maintenance diet, water, and hay *ad libitum* once a day.

Before inclusion, each animal underwent a comprehensive ocular examination to exclude the presence of ocular diseases. Ophthalmic examinations included intraocular pressure (IOP) measurement (mmHg) using applanation tonometry (Tono-Pen AVIA Vet™/ Reichert, USA), slit-lamp biomicroscopy of the anterior segment (SL-15/ Kowa, Tokyo, Japan), direct ophthalmoscopy (Welch Allyn, Skaneateles Falls, USA), and indirect ophthalmoscope (Vantage Plus binocular, Keeler, UK). The study comprised three intervention groups, each with five animals: Group 1: ocular hypertension (OH), Group 2: hWJ-MSCs, and Group 3: OH + hWJ-MSCs. The left eye served as the control in all cases, and animals with posterior segment alterations were not included in the study.

Anesthesia procedure: For the intravitreal injection of hWJ-MSCs and flash-VEP, the animals were anesthetized with ketamine (Ketafine®, Brouwer, Argentina) (35 mg/kg) and xylazine (Xilacina 2%, Erma, Colombia) (8 mg/kg) through intramuscular injections. Prior to the subconjunctival glucocorticoid injection, anesthetic eye drops containing 0.5% proparacaine (Alcaine®, Alcon, Barcelona) were administered. To mitigate the potential complications from tropical anesthesia, artificial tears (Splash Tears, Sophia, Colombia) were instilled twice daily, following IOP measurement.

Induction of ocular hypertension: OH was induced in 10 eyes, with 5 eyes each in G1 and G3. Induction involved twice-daily drops of prednisolone acetate (Prednefrin Forte® Eye drops 10 mg/mL – Allergan, Brazil) and weekly subconjunctival injection of 0.5 mL of betamethasone acetate (Celestone Cronodose®, disodium phosphate, 3+3 mg/mL, Schering-Plough, Mexico) in the right eye over a period of five weeks.

Measurements of intraocular pressure: IOP measurements (mmHg) were taken twice daily (at 7:00 a.m. and 4:00 p.m.) for nine consecutive weeks in both eyes of all experimental animals. The tonometer was calibrated according to the manufacturer's instructions and minimal head and neck restraint were applied to avoid excessive pressure on the eyelids and neck. Five readings were averaged for each eye, IOP measurements with repetitions below a 90% confidence level were discarded and re-measured for accuracy. The eye examined first was chosen randomly using an Excel generated sequence. To ensure consistency across animals and groups, the same examiner performed tonometry in all the cases. OH was defined as IOP exceeding above 15mmHg, based on established IOP levels in rabbits (Pereira *et al.*, 2011).

Isolation and culture of hWJ-MSCs: Umbilical cord samples were collected from full-term births including both caesarean and vaginal deliveries (n=5). Informed consent was obtained and approved by the Ethical Committee (reference 2019EE44993). Exclusion criteria for cord donors considered sociodemographic variables such as age,

nutritional status during pregnancy, drug dependence, history of congenital anomalies, congenital immune or metabolic deficiencies, viral infections (including chickenpox, papillomavirus, HIV, among others), bacterial or parasitic infections during pregnancy, eclampsia, and multiple pregnancies.

The umbilical cord samples were handled aseptically and immediately placed in a container with cold physiological saline solution (0.9% NaCl) and stored at 4°C until arrival at the laboratory. Umbilical cord fragments were washed with 0.9% saline solution containing 1% penicillin/streptomycin (10,000U/mL), and the umbilical veins, arteries, and outer membranes were removed. Wharton's jelly was minced and cultured in flasks containing low glucose Dulbecco's Modified Eagle's medium (Gibco, Life Technologies, USA), supplemented with 10% human platelet lysate (hPL plus) and 8 IU/mL of heparin. The hWJ-MSCs cultures were maintained at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO2 with the culture medium replaced every three days. Once hWJ-MSCs reached 80% confluence, they were subcultured for a few passages and used as cell sources in subsequent experiments. Cells were induced to differentiate into adipocytes, osteocytes, and chondrocytes and hWJ-MSCs were expanded to the third passage and used in subsequent experiments.

Characterization of hWJ-MSCs: Cells were immunophenotypically characterized using antibodies against the following human antigens: CD90-APC, CD73-PE/Cy7, CD105-PE, CD274-PE, CD45-APC/Cy7, CD34-PerCP-Cy5.5, and CD31-PE (*Biolegend, San Diego, USA*), following the manufacturer's instructions for dilution. Appropriate isotype controls were applied for each antibody. Inhibition of $TCD3^+$ was assessed, and the cell suspension underwent analysis for sterility, endotoxins, and mycoplasmas. Flow cytometry analyses were performed using a FACSCanto II™ instrument (*BD, Franklin Lakes, USA*) with da analyzed using the FlowJo vX.7.0 software package (*TreeStar, USA*).

Intravitreal injection of hWJ-MSCs: For intravitreal application of hWJ-MSCs, the eyeball was first aseptically cleaned with 5% povidone-iodine, applied a drop of anesthetic, and a disposable surgical drape was spread around the eyeball. Afterwards, using a surgical microscope (Zeiss, Germany) and a blepharostat, the previously thawed hWJ-MSCs suspension ($1x10^5$cells/100µL) was gently injected 4 mm posterior to the lateral corneal limbus, through the sclera to the vitreous cavity in the region of the pars plana with a 30-gauge needle in the direction of the optic disc in G2 and G3 at week seven. The cells were injected cautiously to prevent direct contact with the lens and to avoid damage to the vortex veins, which might induce eye inflammation and cataracts. The injection was administered slowly over approximately 1 minute).

To prevent the escape of the vitreous-applied solution, gentle pressure was applied to the area using a sterile swab for 1 minute. The control eye received an intravitreal injection of sterile balanced salt solution (BSS™ Sterile, Alcon Laboratories). Animals were monitored daily including ophthalmological examinations of the anterior and posterior segments of the eye, during the postoperative period after the procedure.

Chromatic pupil light reflex and pupillometry measurements: The cPLR was measured in both eyes at weeks 1, 3, 6, and 9 using the Precision Illuminator BPI-50 (Retinographics, Inc., USA). Despite, rabbits lacking photoreceptors for red light, we opted to evaluate their response to it. This decision was made considering the presence of blue (430 nm sensitivity) and green (520 nm sensitivity) cones as well as rods in the rabbit retina (De Monasterio, 1978). This choice accounted for potential spectral interactions in retinal neurons. The assessments occurred in a dark room to stimulate the pupillary function at higher levels (10000 lx±5%) using red light (660 nm), and blue light (465 nm). The red-light response was measured within 5 seconds of high-intensity stimulation. After 10-minute adaptation to darkness pupil recovery, the stimulation test was repeated with blue light using the same protocol. Additionally, baseline pupillary measurements were obtained under ambient light conditions before the procedures. Photographs of the eyes were captured for subsequent analysis of the pupillary diameters using ImageJ application (v.1.53e, Wayne Rasband, USA) was used to measure the pupillary diameter. Pupillary constriction was estimated based on the relative diameter of the pupil at the maximum contraction and rest (relative pupil diameter at maximum constriction) / (relative resting pupil diameter) (Fig. 1). All measurements were consistently performed by the same researcher.

Flash-VEP test: Flash-VEP was employed to evaluate the function of the RGCs and visual pathways. All rabbits were examined using the BPM-300 Retinographics ERG/VEP equipment (Retinographics, Inc., USA) following the International Society for Clinical Electrophysiology of Vision (ISCEV) standards for clinical visual evoked potentials in humans. To minimize potential biases in the flash-VEP recordings, parameters such as body temperature, amount of anesthesia used, and location of the recording electrodes in each evaluation were controlled. Examinations were conducted in both eyes at weeks 1 and 9. Before testing, the pupil dilatation was achieved using a 0.5% tropicamide. The eyes were then opened using a blepharostat. Responses were obtained by stimulating only one eye and recording from the active electrode, while the contralateral eye was obstructed to prevent light stimulation. Flash-VEP signals were recorded using a stainless-steel needle as the active electrode, inserted under the skin above the area of the visual cortex midway between the two ears. Reference and ground electrodes were inserted into the ear. We used a time base of: 5ms/Div, sensitivity of 2µV/Div, stimulus single, inter-test time 2s, intensity 3.0cd-s/m^2, and an average of 64 were given to the right eye. Flash-VEP analysis was based on amplitude (P2) and latency (N2), with both automatically calculated using a computer program after the measurements.

Statistical analyses: The statistical analysis was performed using Jamovi Version 2, presenting results as mean (SD) [IQR]. Normality was assessed using the Shapiro-Wilks test, and for normal distribution, repeated measures ANOVA was employed; otherwise, Friedman

ANOVA. Post hoc tests included Tukey, Bonferroni, Conover, Levene, and Games-Howell based on homoscedasticity. One-way ANOVA or Kruskal-Wallis ANOVA determined differences between groups. Correlation analysis utilized Pearson or Spearman tests. Significance was set at $P<0.05$.

RESULTS

Characterization of hWJ-MSCs: The cultured hWJ-MSCs exhibited a spindle-shaped morphology and adhered to plastic surfaces. Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS) analysis, revealed the positive expression of MSCs markers (CD90, CD73, CD105, and CD274) was positive, while hematopoietic markers (CD45, CD34, and CD31), endothelial marker (CD31), and human leukocyte antigens marker (HLA-DR) were found negative (data not shown). In addition, these cells successfully differentiated into chondrocytes and osteoblasts (data not shown).

The achieved inhibition percentage of $CD3^+$ T cells was found to be ≤87% while, among the utilized total cell concentration $9.58 \times 10^5 \pm 8.88 \times 10^4$ cells/mL/vial, live cell concentration was $9.50 \times 10^5 \pm 8.39 \times 10^4$ cells/mL with a viability of 99.2±0.546% and negative microbiological study.

IOP in an early glaucoma model: The IOP showed a significant increase ($P<0.001$, Kruskal-Wallis ANOVA) in the OH groups from 3rd week of the study (Table 1). Individual analysis revealed significant differences ($P<0.05$) in the OH groups (Supplementary: Table 1, Table 2 and Fig. 1). No significant differences ($P>0.05$) were observed in the control eyes. The maximum IOP values were G1:25.22±12.31[13.0-64.0] mmHg, G2:13.33±3.32 [7.0-25.0] mmHg, and G3:19.16±4.47 [11.0 -42.0] mmHg. Upon suspension of glucocorticoids at week 5, G1 exhibited a sudden increase in IOP compared to G3. Additionally, all groups showed a slightly higher IOP in the afternoon than in the morning, although this difference was not significant, indicating that the animals were adequately acclimatized ($P>0.05$, Kruskal-Wallis ANOVA).

Ophthalmological examination *post* hypertension and hWJ-MSCs application: A complete ophthalmological examination was conducted daily before the induction of ocular hypertension to identify the possible ophthalmological changes produced during the development of the proposed experimental model. When assessing the anterior segment using a slit lamp, no alterations in the corneal curvature or irregularities in the corneal surface were observed with topical anesthesia.

Throughout the five weeks of hypertension induction, no damage to the annexed organs of the eyeball or the presence of blepharospasm, epiphora, or photophobia-indicative of pain or discomfort- were observed in groups G1 and G3. However, starting from week 7 of the study, after the application of hWJ-MSCs, one animal from G3 exhibited intense conjunctival hyperemia, mild corneal edema, rubeosis iridis and iritis, with clinical characteristics changing by week 9 (less conjunctival hyperemia, gray-green iris, and corneal edema). In G2, one animal showed mydriasis without a response to light stimulation at week 9. Following the intravitreal injection of hWJ-MSCs, no posterior segment abnormalities, such as retinal or optic disc issues, were observed in G3.

Baseline pupil size: Analysis of the baseline pupil diameter (mm) showed some differences between the groups (Table 2). G1 exhibited a significant increase in pupillary diameter between weeks 3 and 9 (P=0.05, ANOVA; P=0.160, Tukey test, and P=0.345, Bonferroni test). A similar increase in pupillary diameter was observed in G2 at week 1 compared to week 9 ($P<0.001$; Corrected with Tukey test, and P=0.002, Bonferroni); week 3 compared to week 9 (P=0.004; P=0.012, Corrected with Tukey test, and P=0.023, Bonferroni) and week 6 compared to week 9 (P=0.023; after adjustment, significance was lost, P=0.068, Tukey test, and P=0.141, Bonferroni). However, in G3, clear statistical significance was not found in pupillary diameter between weeks in the post hoc analysis. Regarding the analysis of the differences between the groups during the follow-up period, statistically significant differences were only present in week 9 between the G2 and control groups (P=0.005, Games-Howell) (Table 3, Fig. 2).

Red light stimulation: In cPLR with red light, significant weekly differences in the pupillary diameter in G1 (P=0.025) and G2 (P=0.007) were observed. Notably, G2 presented statistically significant differences between weeks 1 and 9 (P=0.046; correction loss significance P=0.131, Tukey test, and P=0.161, Bonferroni).

A significant increase in pupillary diameter was observed in week 3 (Table 4). In addition, the pupillary size in response to the red stimulus was greater in G2 than in the control at week 3 (P=0.039). Furthermore, G3 demonstrated a significant increase in pupillary diameter in G3 at week 6 compared with that in G2 (P=0.039). Finally, statistically significant differences in the relative pupil size were observed between the groups (P=0.0037) at week 9. Nevertheless, no significant differences were observed in specific groups in the Games-Howell test (Fig. 2).

Blue light stimulation: The cPLR response to blue light exhibited a significant increase in pupillary diameter in all groups; however, the control group did not show alterations in the pupillary response (Table 5). In G2, there was a significant increase in pupillary diameter between weeks 1 and 9 (P=0.034), weeks 3 and 9 (P=0.004), and weeks 6 and 9 (P=0.005,). Additionally, in G3, significant pupillary alterations were observed between weeks 1 and 3 ($P<0.001$), weeks 1 and 6 ($P=0.007$), and weeks 1 and 9 (P=0.003). In contrast, G1 did not show any differences in the Conover test by weeks. (Table 5). In the analysis of differences between the groups, significant variations in the pupillary diameter between all the study groups were observed (Table 6). However, no alterations in pupillary response were found between any group in the post hoc analysis in week one. Large pupillary diameters were noted in G3 than in G2 at week 3 (P=0.039, Games-Howell test), in G1 and control (P=0.039) at week 6 and in G3 and control (P=0.011) at week 6. In comparison to the control, a significant increase in pupil diameter was observed in G2 (P=0.016); G3 (P=0.012), and G1 (P=0.053) at week 9 (Table 6).

Table 1: Analysis of IOP in the different study groups during the study.

IOP	Week 1 Media(SD) [IQR]	Week 2 Media(SD) [IQR]	Week 3 Media(SD) [IQR]	Week 4 Media(SD) [IQR]	Week 5 Media(SD) [IQR]	Week 6 Media(SD) [IQR]	Week 7 Media(SD) [IQR]	Week 8 Media(SD) [IQR]	Week 9 Media(SD) [IQR]
G1	12.8 (2.0) [7.0 - 19.0]	10.5 (2.5) [8.0 - 17.0]	14.3 (2.2) [9.0 - 20.0]	15.1 (2.2) [8.0 - 21.0]	15.5 (3.3) [8.0 - 26.0]	22.0 (7.8) [13.0 - 66.0]	25.2 (12.3) [13.0 - 64.0]	23.8 (14.4) [11.0-74.0]	18.1 (9.9) [12.0-45.0]
G2	12.3 (1.9) [7.0 – 17.0]	11.1 (2.4) [7.0-16.0]	10.8 (1.6) [7.0 – 16.0]	12.0 (1.8) [9.0 – 17.0]	12.9 (1.6) [9.0 – 15.0]	12.3 (3.3) [7.0 – 15.0]	12.7 (2.2) [8.0 – 15.0]	12.2 (1.1) [8.0 – 15.0]	11.6 (1.5) [9.0 – 15.0]
G3	12.2 (2.1) [7.0 – 19.0]	10.2 (3.1) [8.0 – 17.0]	14.2 (3.3) [9.0 – 24.0]	15.3 (3.9) [8.0 - 30.0]	15.2 (4.0) [8.0 - 33.0]	18.2 (3.9) [10.0 - 29.0]	19.2 (4.5) [11.0 - 42.0]	17.2 (4.3) [7.0 – 28.0]	13.2 (3.2) [7.0 – 25.0]

Analysis Kruskal-Wallis ANOVA. G1: ocular hypertension, G2: hWJ-MSCs, G3: ocular hypertension + hWJ-MSCs. Data are presented as mean±SD: Standard Deviation; IQR: Interquartile Range. P<0.05.

Table 2: Analysis of each group's weekly pupil size differences throughout the follow-up time in the baseline light stimulation.

	Baseline pupil size (mm)			
	Week 1 Media (SD) [IQR]	Week 3 Media (SD) [IQR]	Week 6 Media (SD) [IQR]	Week 9 Media (SD) [IQR]	*P*-value
G1	5.7(0.4)[5.2 - 6.0](5 eyes)	5.9(0.9)[5.0 - 7.2](5 eyes)	6.2(0.8)[5.3 - 7.4](5 eyes)	8.0(2.0)[5.4 - 9.6](4 eyes)	0.016*[1]
G2	5.7(0.3)[5.4 - 6.1](5 eyes)	5.8(0.4)[5.3 - 6.2](5 eyes)	5.9(0.6)[5.1 - 6.7](5 eyes)	6.9(0.3)[6.6 - 7.3](4 eyes)	<0.001*[1]
G3	6.0(0.6)[5.3 - 6.9](5 eyes)	6.0(0.9)[5.2 - 7.4](5 eyes)	5.9(0.9)[5.2 - 7.3](5 eyes)	7.1(1.0)[5.4 - 8.2](5 eyes)	0.042*[1]
CONTROL	5.9(0.5)[5.1 - 6.7](15 eyes)	5.8(0.5)[5.1 - 6.6](15 eyes)	5.9(0.6)[4.9 - 6.7](15 eyes)	5.9(0.6)[5.0 - 6.9](14 eyes)	0.994*[1]

Repeated measures ANOVA; [1]Friedman's ANOVA. G1: ocular hypertension, G2: hWJ-MSC, G3: ocular hypertension + hWJ-MSC. Controls of every group correspond to the left eye of the same rabbit. Data are presented as mean±SD: Standard Deviation; IQR: Interquartile Range. mm: millimeters. P<0.05.

Table 3: Analysis of the differences between the groups for each follow-up week, under baseline light stimulation.

	Baseline pupil size (mm)				
TIME DURATION	G1 Media (SD) [IQR]	G2 Media (SD) [IQR]	G3 Media (SD) [IQR]	Control Media (SD) [IQR]	*P*-value
WEEK 1	5.7(0.4) [5.2 – 6.0](5eyes)	5.7 (0.3)[5.4 – 6.1](5 eyes)	6.0 (0.6)[5.3 – 6.9](5 eyes)	5.9 (0.5)[5.1 – 6.7](15 eyes)	0.674[1]
WEEK 3	5.9(0.9)[5.0 – 7.2](5 eyes)	5.8 (0.4)[5.3 – 6.2](5 eyes)	6.0 (0.9)[5.2 – 7.4](5 eyes)	5.8 (0.5)[5.1 – 6.6](15 eyes)	0.981[2]
.WEEK 6	6.2(0.8)[5.3 - 7.4](5 eyes)	5.9 (0.6)[5.1 - 6.7](5 eyes)	5.9 (0.9)[5.2 - 7.3](5 eyes)	5.9 (0.6)[4.9 - 6.7](15 eyes)	0.893[1]
WEEK 9	8.0(2.0)[5.4 - 9.6](4 eyes)	6.9 (0.3)[6.6 - 7.3](4 eyes)	7.1 (1.0)[5.4 - 8.2](5 eyes)	5.9 (0.6)[5.0 - 6.9](14 eyes)	0.011*[1]

[1] One-way ANOVA; [2]Kruskal-Wallis ANOVA. G1: ocular hypertension, G2: hWJ-MSC, G3: ocular hypertension + hWJ-MSC. Controls are a mixed of the three groups. Data are presented as mean±SD: Standard Deviation; IQR: Interquartile Range. mm: millimeters. P<0.05.

Table 4: Analysis of the differences between the groups for each follow-up week under red light stimulation.

	Red pupil size (mm)				
TIME DURATION	G1 Media (SD) [IQR]	G2 Media (SD) [IQR]	G3 Media (SD) [IQR]	Control Media (SD) [IQR]	*P*-value
WEEK 1	5.0(0.8)[4.0 - 5.9](5 eyes)	4.2 (0.6)[3.4 - 4.9](5 eyes)	5.0(1.0)[3.9 - 6.5](5 eyes)	5.1(1.1)[3.4 - 6.9](15 eyes)	0.215[1]
WEEK 3	5.6(1.1)[4.5 - 6.9](5 eyes)	4.6 (0.4)[4.1 - 5.0](5 eyes)	5.5(0.7)[4.5 - 6.3](5 eyes)	5.5(0.9)[3.8 - 6.9](15 eyes)	0.044*[2]
WEEK 6	5.5(1.0)[4.2 - 6.5](5 eyes)	4.6 (0.5)[3.8 - 5.2](5 eyes)	5.6(0.5)[4.9 - 6.1](5 eyes)	5.0(1.2)[3.0 - 6.6](15 eyes)	0.047[1]
WEEK 9	7.2(1.6)[5.2 - 8.8](4 eyes)	6.0 (1.3)[4.7 - 7.8](4 eyes)	6.1(1.0)[4.4 - 6.8](5 eyes)	5.1(0.8)[3.9 - 6.6](14 eyes)	0.037*[2]

[1]One-way ANOVA; [2]Kruskal-Wallis ANOVA. G1: ocular hypertension, G2: hWJ-MSC, G3: ocular hypertension + hWJ-MSC. Controls are mixed of the three groups. Data are presented as mean±SD: Standard Deviation; IQR: Interquartile Range. mm: millimeters. P<0.05.

Table 5: Analysis of the weekly differences in pupil size in each group throughout the follow-up time in the blue light stimulation.

	Blue pupil size (mm)				
	Week 1 Media (SD) [IQR]	Week 3 Media (SD) [IQR]	Week 6 Media (SD) [IQR]	Week 9 Media (SD) [IQR]	*P*-value
G1	2.8(0.3)[2.3 - 3.1](5 eyes)	4.4 (1.7)[2.8 - 7.3](5 eyes)	4.6(1.8)[2.9 - 7.6](5 eyes)	6.0(2.4)[6.0 (2.4)](4 eyes)	0.024*[1]
G2	2.7(0.4)[2.2 - 3.4](5 eyes)	2.7 (0.5)[2.0 - 3.1](5 eyes)	2.7(0.7)[2.1 - 3.8](5 eyes)	4.8(0.4)[4.8 (0.4)](4 eyes)	0.044*[2]
G3	3.1(0.1)[3.0 - 3.2](5 eyes)	4.1 (1.0)[3.4 - 5.8](5 eyes)	3.9(0.9)[3.3 - 5.5](5 eyes)	4.0(0.8)[4.0 (0.8)](5 eyes)	0.014*[2]
CONTROL	2.8(0.4)[2.2 - 3.6](15 eyes)	2.9 (0.4)[2.2 - 3.7](15 eyes)	2.7(0.5)[1.7 - 3.4](15 eyes)	2.8(0.5)[2.8 (0.5)](14 eyes)	0.8[1]

[1]Repeated measures ANOVA; [2]Friedman's ANOVA. G1: ocular hypertension, G2: hWJ-MSC, G3: ocular hypertension + hWJ-MSC. Controls of every group correspond to the left eye of the same rabbit. Data are presented as mean±SD: Standard Deviation; IQR: Interquartile Range. mm: millimeters. P<0.05.

Table 6: Analysis of the differences between the groups for each follow-up week under blue light stimulation.

	Blue pupil size (mm)				
TIME DURATION	G1 Media(SD) [IQR]	G2 Media(SD) [IQR]	G3 Media(SD) [IQR]	Control Media(SD) [IQR]	*P*-value
WEEK 1	2.8 (0.3)[2.3 - 3.1](5 eyes)	2.7 (0.4)[2.2 - 3.4](5 eyes)	3.1 (0.1)[3.0 - 3.2](5 eyes)	2.8 (0.4)[2.2 - 3.6](15 eyes)	0.019*[1]
WEEK 3	4.4 (1.7)[2.8 - 7.3](5 eyes)	2.7 (0.5)[2.0 - 3.1](5 eyes)	4.1 (1.0)[3.4 - 5.8](5 eyes)	2.9 (0.4)[2.2 - 3.7](15 eyes)	0.003*[2]
WEEK 6	4.6 (1.8)[2.9 - 7.6](5 eyes)	2.7 (0.7)[2.1 - 3.8](5 eyes)	3.9 (0.9)[3.3 - 5.5](5 eyes)	2.7 (0.5)[1.7 - 3.4](15 eyes)	0.003*[2]
WEEK 9	6.0 (2.4)[6.0 (2.4)](4 eyes)	4.8 (0.4)[4.8 (0.4)](4 eyes)	4.0 (0.8)[4.0 (0.8)](5 eyes)	2.8 (0.5)[2.8 (0.5)](14 eyes)	<0.001*[2]

[1]One Way ANOVA; [2]kruskal-wallis ANOVA. G1: ocular hypertension, G2: hWJ-MSC, G3: ocular hypertension + hWJ-MSC. Controls are mixed of the three groups. Data are presented as mean±SD: standard deviation; IQR: interquartile range. mm: millimeters. P<0.05.

Amplitude and latency measurements: In the flash-VEP test analysis, a non-significant reduction in N2 (latency) was observed in G1 at week 1 (23.6±10.3 [14.2-40.8] ms), compared to week 9 (13.6±3.7 [10.0-18.2] ms, P=0,491). However, an increase was found in G2 at week 1 (21.9 ±13.3 [11.0-41.5] ms) compared to week 9 (28.3±18.2 [13.0-52.5] ms, P=0.437) and in G3 at week 1 (21.2± 14.4[12.2-42.5] ms), compared to week 9 (21.5±10.7 [10.0-33.2] ms, P=0.779). Latency did not differ significantly between the groups at week 1 (P=0,87) and week 9 (P=0,54). It was observed that the groups which received cell therapy (G2 and G3) exhibited higher latencies compared to the control group, however, the difference was not statistically significant.

In P2 (amplitude), a reduction was observed in G1 at week 1 (18.5±9.9 [5.3-26.9] µv), compared to week 9 (12.6±2.7 [9.8-16.1] µv, P=0.07). However, there were no changes in G2 at week 1 (12.5±4.7 [7.4-18.8] µv), compared

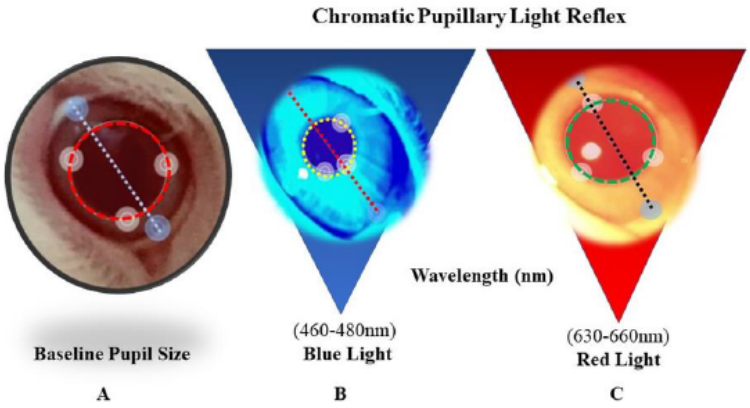


Fig. 1: Pupillary diameter measurement (mm): A line is drawn starting at the lateral limbus and ending at the medial limbus, crossing the central axis of the eye. The pupil is marked by a central line. Pupil diameter is determined by the degree of constriction of the pupil in response to light. **mm:** millimeters. A: Baseline Pupil Reflex, B: Pupillary diameter under blue light, C: Pupillary diameter under red light.

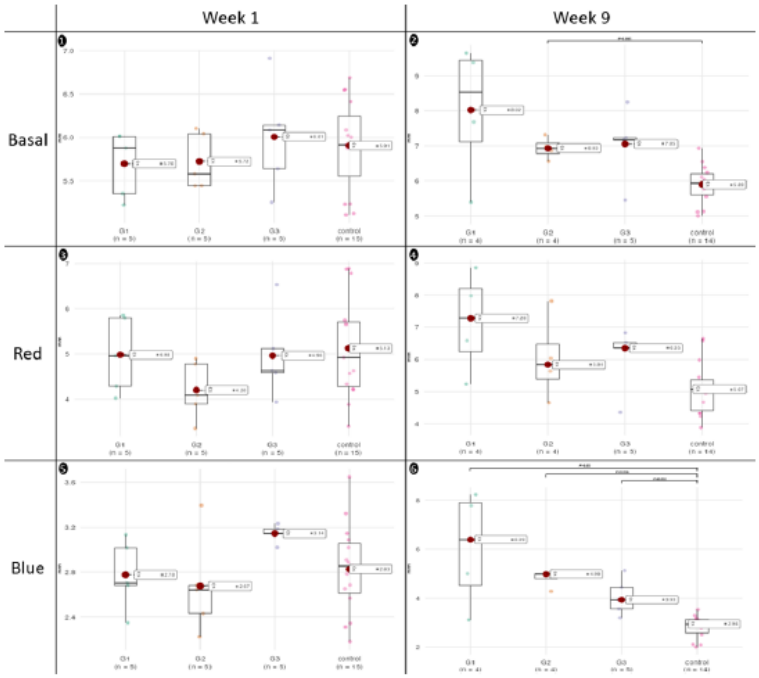


Fig. 2: Chromatic Pupillary Light Reflex. Changes are recorded in pupil diameter during, basal, blue, and red light in the study groups at weeks 1 and 9. Repeated measures ANOVA; Friedman's ANOVA. P<0.05. 1,3,5: eyes week 1 and 2,4,6: eyes week 9. **G1:** ocular hypertension, **G2:** hWJ-MSCs and **G3:** ocular hypertension + hWJ-MSCs

to week 9 (12.6±6.5 [4.1-20.1] µv, P=0.65). Nonetheless, a small increase in G3 at week 1 (10.9±3.3 [7.4-15.4] µv), compared to week 9 (15.2±5.8 [8.0-24.3] µv, P=0.268) was observed. The amplitude did not differ significantly between the groups at weeks 1 (P=0.48) and 9 (P=0.86). Finally, no statistically significant correlations were observed when correlating blue light stimulation with amplitude and latency.

DISCUSSION

Early diagnosis of glaucoma is essential to prevent permanent structural damage and irreversible vision loss. Typically, glaucoma detection relies on examining structural damage to the optic nerve combined alongside measurements of visual function. However, clinical examination of the optic nerve is often subjective and prone to variability. This has led to an increasing demand for research into new objective methods to aid in diagnosing glaucoma (Sharma *et al*., 2008).

In this study, we developed an ocular hypertension (OH) model capable of inducing rapid changes in retinal function. Furthermore, we demonstrated that cPLR can serve as an early biomarker of the functional changes in ipRGCs induced by this OH model and subsequent cell therapy. To our knowledge, this is the first study to illustrate that intravitreal application of human hWJ-MSCs can impact the diameter of pupillary response, signifying changes in retinal and optic nerve function. However, it may not fully restore retinal function. MSCs secrete growth factors, cytokines, and exosomes, producing regenerative and reparative effects in the microenvironment, potentially explaining the changes in the function of the retina and optic nerve after intravitreal application of hWJ-MSCs (Lai *et al*., 2010; Tuekprakhon *et al*., 2021).

Supplementary Table 1: Validation of the ocular hypertension model. Individual analysis of IOP in Group 1 during the study.

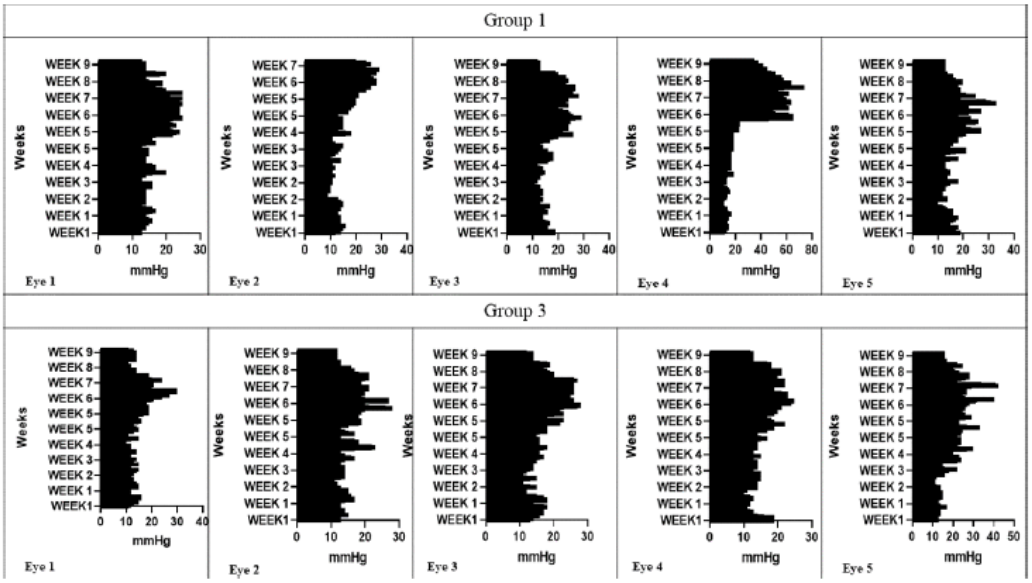
Group 1	Week1 Mean(SD) [Range]	Week2 Mean(SD) [Range]	Week3 Mean(SD) [Range]	Week4 Mean(SD) [Range]	Week5 Mean(SD) [Range]	Week6 Mean(SD) [Range]	Week7 Mean(SD) [Range]	Week8 Mean(SD) [Range]	Week9 Mean(SD) [Range]	*P* value
Eye 1	12.8 (1.5) [10.0 - 17.0]	10.6 (2.4) [6.0 - 16.0]	12.0 (2.5) [8.0 - 20.0]	12.9 (1.7) [10.0 - 17.0]	15.1 (3.8) [9.0 - 24.0]	19.1 (2.6) [13.0 - 25.0]	19.2 (2.7) [14.0 - 25.0]	14.6 (2.4) [11.0 - 20.0]	13.2 (0.9) [12.0 - 14.0]	<0.001
Eye 2	11.8 (1.8) [7.0 - 16.0]	8.9 (2.3) [4.0 - 14.0]	10.0 (1.7) [6.0 - 14.0]	11.8 (1.9) [9.0 - 18.0]	14.9 (3.2) [8.0 - 21.0]	20.9 (4.3) [13.0 - 29.0]	21.9 (2.7) [17.0 - 26.0]	NA[NA]	NA[NA]	<0.001
Eye 3	12.6 (2.2) [7.0 - 19.0]	11.8 (1.8) [7.0 - 17.0]	11.3 (1.3) [8.0 - 15.0]	13.2 (2.2) [8.0 - 18.0]	15.2 (3.8) [10.0 - 26.0]	21.3 (2.9) [15.0 - 29.0]	19.4 (2.7) [15.0 - 28.0]	18.3 (2.8) [11.0 - 27.0]	12.5 (0.5) [12.0 - 13.0]	<0.001
Eye 4	12.6 (1.8) [9.0 - 17.0]	11.1 (2.4) [6.0 - 16.0]	11.7 (2.0) [8.0 - 19.0]	14.5 (1.4) [13.0 - 17.0]	17.5 (1.0) [16.0 - 19.0]	30.2 (13.2) [18.0 - 66.0]	45.4 (9.0) [25.0 - 64.0]	46.8 (10.2) [21.0 - 74.0]	34.0 (7.2) [16.0 - 45.0]	<0.001
Eye 5	14.1 (1.9) [8.0 - 19.0]	10.1 (2.4) [5.0 - 14.0]	11.4 (2.5) [5.0 - 18.0]	12.9 (2.5) [10.0 - 21.0]	14.9 (2.8) [11.0 - 26.0]	18.6 (3.3) [13.0 - 27.0]	17.9 (4.3) [13.0 - 33.0]	15.6 (1.7) [12.0 - 20.0]	12.7 (0.5) [12.0 - 13.0]	<0.001

Analysis Kruskal-Wallis ANOVA. Group 1: ocular hypertension. Data are presented as mean±SD: Standard Deviation; IQR: Interquartile Range. P<0.05

Supplementary Table 2: Validation of the ocular hypertension model. Individual analysis of IOP in Group 3 during the study.

Group 3	Week1 Mean(SD) [Range]	Week2 Mean(SD) [Range]	Week3 Mean(SD) [Range]	Week4 Mean(SD) [Range]	Week5 Mean(SD) [Range]	Week6 Mean(SD) [Range]	Week7 Mean(SD) [Range]	Week8 Mean(SD) [Range]	Week9 Mean(SD) [Range]	*P* value
Eye 1	11.5 (2.2) [5.0 - 16.0]	11.1 (2.1) [6.0 - 15.0]	9.4 (2.5) [5.0 - 15.0]	9.8 (1.8) [8.0 - 15.0]	12.7 (2.2) [8.0 - 19.0]	16.1 (3.2) [10.0 - 27.0]	17.8 (4.1) [11.0 - 30.0]	12.0 (3.0) [7.0 - 19.0]	10.5 (1.5) [8.0 - 14.0]	<0.001
Eye 2	12.3 (1.8) [8.0 - 17.0]	10.6 (2.5) [6.0 - 16.0]	11.6 (2.5) [7.0 - 17.0]	13.2 (3.1) [10.0 - 23.0]	13.3 (2.5) [9.0 - 19.0]	17.0 (3.5) [12.0 - 28.0]	16.5 (1.6) [14.0 - 21.0]	16.3 (2.3) [12.0 - 21.0]	11.4 (2.4) [2.0 - 16.0]	<0.001
Eye 3	13.1 (2.5) [7.0 - 18.0]	10.8 (2.5) [6.0 - 17.0]	10.9 (2.0) [8.0 - 15.0]	12.8 (2.7) [8.0 - 18.0]	15.3 (2.9) [10.0 - 23.0]	19.3 (4.0) [14.0 - 28.0]	20.8 (2.8) [15.0 - 26.0]	18.4 (4.2) [11.0 - 27.0]	13.5 (2.3) [10.0 - 19.0]	<0.001
Eye 4	11.9 (2.4) [8.0 - 19.0]	10.0 (2.1) [6.0 - 15.0]	12.3 (1.2) [9.0 - 15.0]	11.9 (1.5) [9.0 - 15.0]	14.0 (2.6) [10.0 - 22.0]	17.1 (3.0) [12.0 - 25.0]	17.4 (1.9) [15.0 - 23.0]	17.6 (2.0) [13.0 - 22.0]	14.0 (2.6) [10.0 - 21.0]	<0.001
Eye 5	12.3 (1.1) [10.0 - 17.0]	10.6 (2.5) [6.0 - 15.0]	13.6 (2.9) [8.0 - 24.0]	18.5 (3.7) [13.0 - 30.0]	20.9 (3.5) [14.0 - 33.0]	21.6 (3.0) [16.0 - 29.0]	23.3 (6.2) [15.0 - 42.0]	21.5 (2.9) [17.0 - 28.0]	16.7 (2.8) [13.0 - 25.0]	<0.001

Analysis Kruskal-Wallis ANOVA. Group 3: ocular hypertension + hWJ-MSCs. Data are presented as mean±SD: standard deviation; IQR: interquartile range. P<0.05



Supplementary Figure 1: Validation of the ocular hypertension model. Individual analysis of IOP in Group 1 and Group 3 during the study. Analysis ANOVA Friedman. Group 1: ocular hypertension. Group 3: ocular hypertension + hWJ-MSCs. IOP: intraocular pressure. IOP measurement: mmHg

Complications typically associated with glaucomatous disease might not manifest in our experimental animal model due to abbreviated research duration in these animals (AlmasiehL and Levin, 2017). Despite inducing OH within short frame, we were able to observe its effects on the optic nerve and retina in the OH group, augmented by hWJ-MSCs. According to a study, changes in rabbit retinas can be detected just four days after applying human MSCs in the vitreous (Xuqian *et al.*, 2011). In our study, these changes were detected early in the cPLR. Similar findings have been reported in the literature for an OH model, showing reduced pupillary responses to blue and red light intensities (Najjar *et al.*, 2018). Interestingly, when evaluating responses to red light, we observed an increase in pupillary diameter in all the study groups, although it was not significant in the OH group that received cell therapy. Since rabbits only possess S and M cones, and lack L cones (responsible for the response to red

light), this finding suggests interactions with other wavelengths (De Monasterio, 1978; Soukup *et al*., 2019).

As reported in the literature, deficiencies in pupillary responses to blue light were observed in the OH groups compared to non-intervened eyes (Najjar *et al*., 2018). Moreover, the OH group that received hWJ-MSCs exhibited tendency to maintain a consistent pupillary diameter in response to the intensity of blue light after cell therapy application unlike the group without therapy. This observation in cPLR can be attributed to the ability of RGCs and other neuronal cell types survive for extended periods after disturbances, allowing them to respond to light stimuli (Lin *et al*., 2008). The observed effect on pupil diameter following hWJ-MSCs application could indicate a possible neuroprotective effect of cell therapy on the retina. An incidental finding revealed a trend towards an altered pupillary diameter in the group that received the cell transplant without OH (a smaller pupillary diameter was observed in the control group than in G2). This phenomenon may be linked to the activation of the intraocular immune response and the release of cytokines and inflammatory mediators the xenotransplantation (Taylor, 2009).

In early glaucoma, an increased latency was observed in the VEP test. This alteration, occurring prior to apoptosis serves as aa potential indicator of functional damage in RGCs (Tai, 2018). Latency measurement can indicate when RGCs are at risk, prompting the need for early intervention to avoid irreversible cell damage. By using the intravitreal route, positioned directly adjacent to the RGCs layer, we hypothesized enhanced neuroprotection with cell therapy. The neuroprotective effects of hWJ-MSCs-induced neuroprotection are linked to their intrinsic characteristics, , which include secret neurotrophic factors that improve the functional integrity of RGCs connections (Mead *et al*., 2013). Additionally, the intravitreal route of administration requires a smaller volume of applied cells compared to systemic application (Nomura *et al*., 2005). However, our results for flash-VEP did not show a functional improvement in the latency of animals that received cell transplantation, aligning with the findings described by Vilela *et al*. (2021). Two possible explanations for our observations are: 1) the intravitreal application of stromal cells may not be completely innocuous; or 2) the increased expression in glial fibrillary acidic protein (GFAP) might induce axonal regeneration, leading to metabolic dysfunction and electrophysiological disturbance of neurons (Vázquez-Chona *et al*., 2011). However, we observed an increase in amplitude in the OH group treated with stem cells, demonstrating potential beneficial effects on RGCs, as described by our cPLR findings.

Throughout the experiment, we did not observe significant differences in latency and wave amplitude measurement between the flash-PEV groups. The influence of small sample size on cell therapy results should be acknowledged, as this can reduce the statistical power. Indeed, studies with a larger number of eyes have reported statistically significant outcomes. However, drawing conclusions about the effect these cells have on the retina's electrical response is challenging. Previous studies have reported that intravitreally injected cells may obstruct the passage of light to the eye by covering the back of lens, thereby altering the electrophysiological analysis (Ezquer *et al*., 2016). Therefore, further research is required to fully understand this effect.

The combination of cPLR and electrophysiological methods that measure both the function of the optic nerve and the brain response to visual stimuli in rabbits carried out with the RetinoGraphics device in experimental models of glaucoma early have not been previously employed., This poses challenges in comparing our results with existing studies, as data interpretation depends on various factors, including the distance from the light stimuli, the temperature of the animal, and the specific protocol utilized (Firan *et al*., 2020).

Conclusions: Our study reveals that: 1) the changes induced by OH can be recognized early using the cPLR technique, offering potential benefits for the detection and monitoring of glaucoma; 2) transplantation of umbilical cord hWJ-MSCs can have an impact on ipRGCs, discernable through early measurements of the pupillary diameter; and 3) minimal changes in retinal and optic nerve function were observable through cell therapy. This study contributes to the growing body of research showcasing the potential use of cell therapies in neurodegenerative diseases and provides insights in the early diagnosis of glaucoma for potential clinical applications. However, further research into the role of hWJ-MSCs within the cellular microenvironment post-transplantation is essential to investigate the long-term effects of cell therapy and understand the specific mechanisms underlying pupillary responses in glaucoma patients. Future studies hold the promise of deepening our understanding of glaucoma pathogenesis and advancing innovative treatment approaches.

Authors' contribution: KSE: conceived, designed, performed the experiments, and wrote the manuscript; CHCG: contributed analysis tools and wrote the manuscript; WRC: contributed analysis tools and wrote the manuscript; CVA and CTC: conceived and performed the experiments; MCA and GS: contributed reagents and materials; CRS: wrote the manuscript and Alejandra de-la-Torre: conceived, designed, performed the experiments and wrote the manuscript.

Acknowledgments: We would like to express our sincere gratitude to the Universidad del Rosario, Colombia, and Escuela Superior de Oftalmología del Instituto Barraquer de América, Colombia for their support in this project.

REFERENCES

Adak S, Magdalene D, Deshmukh S *et al*., 2021. A review on mesenchymal stem cells for treatment of retinal diseases. Stem Cell Rev Reports 17:1154–1173.

AlmasiehL M and Levin LA, 2017. Neuroprotecti on in Glaucoma: Animal models and clinical trials. Annual Rev Vision Sci 3:91–120.

Arévalo-López C, Gleitze S, Madariaga S, *et al*., 2023. Pupillary response to chromatic light stimuli as a possible biomarker at the early stage of glaucoma: a review. Int Ophthalmol 43:343–356.

Arrigo A, Aragona E, Saladino A, *et al*., 2021. Cognitive dysfunctions in Glaucoma: An overview of morpho-functional mechanisms and the impact on higher-order visual Function. Front Aging Neurosci 13:747050.

De Monasterio FM, 1978. Spectral interactions in horizontal and ganglion cells of the isolated and arterially perfused rabbit retina. Brain Research 150:239–258.

De Silva SR, Barnard AR, Hughes S, *et al.*, 2017. Long-term restoration of visual function in end-stage retinal degeneration using subretinal human melanopsin gene therapy. Proc Natl Acad Sci USA 114:11211–11216.

Drela K, Lech W, Figiel-Dabrowska A, *et al.*, 2016. Enhanced neuro-therapeutic potential of Wharton's Jelly–derived mesenchymal stem cells in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells culture. Cytotherapy 18:497–509.

Ezquer M, Urzua CA, Montecino S, *et al.*, 2016. Intravitreal administration of multipotent mesenchymal stromal cells triggers a cytoprotective microenvironment in the retina of diabetic mice. Stem Cell Res Ther 7:42.

Firan AM, Istrate S, Iancu R, *et al.*, 2020. Visual evoked potential in the early diagnosis of glaucoma. Literature review. Rom J Ophthalmol 64:15–20.

Graham KL, McCowan CI and White A, 2020. Protocol for assessment of the pupillary light reflex in dogs without chemical restraint: preliminary investigation. J Small Animal Prac 61:637–643.

Johnson TV, Bull ND, Hunt DP, *et al.*, 2010. Neuroprotective Effects of Intravitreal Mesenchymal Stem Cell Transplantation in Experimental Glaucoma. Invest Opthalmol Vis Sci 51:2051.

Lai RC, Arslan F, Lee MM, *et al.*, 2010. Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. Stem Cell Res 4:214–222.

Lin B, Koizumi A, Tanaka N, *et al.*, 2008. Restoration of visual function in retinal degeneration mice by ectopic expression of melanopsin. Proc Natl Acad Sci USA 105:16009–16014.

Mead B, Logan A, Berry M, *et al.*, 2013. Intravitreally transplanted dental pulp stem cells promote neuroprotection and axon regeneration of retinal ganglion cells after optic nerve injury. Invest Ophthalmol Vis Sci 54:7544–7556.

Mead B, Hill LJ, Blanch RJ, *et al.*, 2016. Mesenchymal stromal cell–mediated neuroprotection and functional preservation of retinal ganglion cells in a rodent model of glaucoma. Cytotherapy 18:487-96.

Najjar RP, Sharma S, Atalay E, *et al.*, 2018. Pupillary Responses to Full-Field Chromatic Stimuli Are Reduced in Patients with Early-Stage Primary Open-Angle Glaucoma. Ophthalmology 125:1362–1371.

Nauta AJ and Fibbe WE, 2007. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. Blood 110:3499–3506.

Nomura T, Honmou O, Harada K, *et al.*, 2005. I.v. infusion of brain-derived neurotrophic factor gene-modified human mesenchymal stem cells protects against injury in a cerebral ischemia model in adult rat. Neuroscience 136:161–169.

Pereira FQ, Bercht BS, Soares MG, *et al.*, 2011. Comparison of a rebound and an applanation tonometer for measuring intraocular pressure in normal rabbits. Vet Ophthalmol 14:321–326.

Rukmini AV, Milea D and Gooley JJ, 2019. Chromatic pupillometry methods for assessing photoreceptor health in retinal and optic nerve diseases. Front Neurol 10.

Scott EM, Boursiquot N, Beltran WA, *et al.*, 2013. Early histopathologic changes in the retina and optic nerve in canine primary angle-closure glaucoma. Vet Ophthalmol 16:79–86.

Sharma P, Sample PA, Zangwill LM, *et al.*, 2008. Diagnostic Tools for Glaucoma Detection and Management. Surv Ophthalmol 53:S17.

Soukup P, Maloca P, Altmann B, *et al.*, 2019. Interspecies variation of outer retina and choriocapillaris imaged with optical coherence tomography. Invest Ophthalmol Vis Sci 60:3332–3342.

Suo L, Zhang D, Qin X, *et al.*, 2020. Evaluating state-of-the-art computerized pupillary assessments for glaucoma detection: A systematic review and meta-analysis. Frontiers in Neurology 11.

Tai TYT, 2018. Visual evoked potentials and glaucoma. Asia-Pacific J Ophthalmol 7:352–355.

Tang J, Qin N, Chong Y, *et al.*, 2018. Nanowire arrays restore vision in blind mice. Nat Commun 9:786.

Taylor AW, 2009. Ocular immune privilege. Eye 23:1885–1889.

Terakado K, Yogo T, Nezu Y, *et al.*, 2013. Efficacy of the use of a colorimetric pupil light reflex device in the diagnosis of fundus disease or optic pathway disease in dogs. J Vet Med Sci 75:1491–1495.

Tuekprakhon A, Sangkitporn S, Trinavarat A, *et al.*, 2021. Intravitreal autologous mesenchymal stem cell transplantation: a non-randomized phase I clinical trial in patients with retinitis pigmentosa. Stem Cell Res Therapy 12:52.

Vázquez-Chona FR, Swan A, Ferrell WD, *et al.*, 2011. Proliferative reactive gliosis is compatible with glial metabolic support and neuronal function. BMC Neurosci 12:1–11.

Vilela CAP, Messias A, Calado RT, *et al.*, 2021. Retinal function after intravitreal injection of autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in advanced glaucoma. Doc Ophthalmol 143:33–38.

Wislet-Gendebien S, Hans G, Leprince P, *et al.*, 2005. Plasticity of cultured mesenchymal stem cells: switch from nestin-positive to excitable neuron-like phenotype. Stem Cells 23:392–402.

Xuqian W, Kanghua L, WeiHong Y, *et al.*, 2011. Intraocular transplantation of human adipose-derived mesenchymal stem cells in a rabbit model of experimental retinal holes. ORE 46:199–207.

CONCLUSIONES:

- Respuesta Pupilar Fotocromática: Al analizar las respuestas a la luz roja, se observó un aumento del diámetro pupilar en todos los grupos de estudio, lo que sugiere posibles interacciones con otras longitudes de onda en este modelo animal. En contraste, se identificaron deficiencias en las respuestas pupilares a la luz azul en los grupos con HO en comparación con los ojos no intervenidos. Sin embargo, el grupo con HO que recibió MSCs derivadas de la WJ-MSCs mostró una tendencia a mantener un diámetro pupilar constante en respuesta a la luz azul después de la terapia celular, en comparación con el grupo que no recibió tratamiento. Este comportamiento podría atribuirse a la capacidad de las células ganglionares de la retina y otras células neuronales para sobrevivir durante períodos prolongados tras perturbaciones, permitiéndoles responder a estímulos luminosos. Por lo tanto, el mantenimiento del diámetro pupilar tras la aplicación de WJ-MSCs sugiere un posible efecto neuroprotector de la terapia celular en la retina.

- En la prueba flash-VEP: Los resultados no mostraron mejoras funcionales en la latencia de los animales que recibieron el trasplante celular. Dos explicaciones plausibles para estos hallazgos son: (1) la aplicación intravítrea de células estromales puede no ser completamente inocua, y (2) el aumento en la expresión de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) podría inducir la regeneración axonal, lo que podría ocasionar disfunciones metabólicas y alteraciones electrofisiológicas en las neuronas. Sin embargo, se observó un incremento en la amplitud en el grupo de animales con HO tratados con células madre, lo que sugiere posibles efectos beneficiosos sobre las células ganglionares de la retina, en concordancia con los hallazgos de la prueba de RPF.

- **CAPÍTULO 3: "Evaluar el efecto neuroprotector de la aplicación de MSCs en la retina y nervio óptico, así como su relación con las respuestas inmune e inflamatoria."**

ANEXO 4: **Análisis histológico y morfológico**; **Inmunohistoquímica**; **Análisis de citoquinas y mediadores inflamatorios** y **Análisis de respuesta inmune**.

❖ INTRODUCCIÓN

El glaucoma es una enfermedad neurodegenerativa prevalente que afecta al nervio óptico, caracterizada por la degeneración progresiva de las células ganglionares y los axones de la retina. Aunque la PIO elevada se considera el principal factor de riesgo, también se observa daño neural en individuos con PIO normal, lo que se conoce como glaucoma de tensión normal. La evidencia científica reciente sugiere la posible implicación de mecanismos autoinmunes en el daño de las células neurales asociado a esta enfermedad. Las enfermedades autoinmunes afectan aproximadamente al 5% de la población adulta y se distinguen por una respuesta inmunitaria exagerada dirigida contra componentes normales de las células y tejidos del organismo, a menudo acompañada de una regulación inmunológica alterada. Este fenómeno puede desencadenar disfunciones, daños o la destrucción del tejido afectado. Se ha observado en pacientes y modelos animales de glaucoma la presencia de respuestas autoinmunes, evidenciada por la detección de anticuerpos y respuestas de células T a proteínas de choque térmico (HSP), junto con cambios neurodegenerativos e infiltración de inmunoglobulinas y linfocitos T.

En este contexto, se ha sugerido que el aumento de la PIO podría comprometer la barrera hematorretiniana, afectando así el privilegio inmunológico del ojo. Aunque las enfermedades autoinmunes suelen responder a la terapia inmunosupresora, como los corticosteroides, en el caso del glaucoma, el uso de estos puede inducir un aumento de la PIO. Actualmente, no existen estudios que demuestren que la terapia con corticosteroides sea capaz de modificar la homeostasis intraocular lo suficiente como para reducir la infiltración de linfocitos T y los niveles de citoquinas proinflamatorias en pacientes con glaucoma.

La presencia de linfocitos activados en el glaucoma puede estar asociada con una progresión más rápida o severa de la enfermedad, ya que estos linfocitos pueden secretar citoquinas y otros

mediadores inflamatorios que promueven la inflamación en el ojo, afectando directamente a las células ganglionares de la retina. El hallazgo de linfocitos activados podría tener implicaciones terapéuticas significativas, como el uso de MSCs para modular la respuesta inmunitaria y reducir la progresión del glaucoma. Las MSCs han demostrado propiedades neuroprotectoras en enfermedades como el glaucoma a través de varios mecanismos: a) Efectos antiinflamatorios: Las MSCs pueden modular la respuesta inmunitaria y reducir la inflamación en el entorno retiniano. Al disminuir la actividad de las células del sistema inmunitario y la liberación de citoquinas proinflamatorias, pueden proteger a las células nerviosas de la retina del daño causado por la inflamación crónica asociada al glaucoma; b) Secreción de factores neurotróficos: como el factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y el factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1), que promueven la supervivencia y el crecimiento de las células nerviosas en la retina; c) Estimulación de la regeneración celular: Las MSCs pueden promover la regeneración celular al interactuar con las células de la retina y estimular su capacidad de autorrenovación y diferenciación hacia células funcionales, incluidas las células ganglionares de la retina y d) Modulación del microambiente retiniano: disminuye la fibrosis y la formación de cicatrices, lo que crea un entorno más propicio para la regeneración y la función celular normal.

En este estudio, se examina el efecto de la aplicación intravítrea de hWJ-MSCs mediante la evaluación de los niveles de citoquinas intraoculares y se investiga el posible impacto de esta aplicación en las respuestas inmunitarias celulares en la retina y el nervio óptico en un entorno inmunosuprimido.

Artículo IV.

Ophthalmic Research

Research Article

Ophthalmic Res 2024;67:232–247
DOI: 10.1159/000538183

Received: September 6, 2023
Accepted: February 28, 2024
Published online: March 8, 2024

Mesenchymal Stromal Cells from Human Wharton's Jelly Modulate the Intraocular Immune Response in a Glucocorticoid Hypertension Model: An Exploratory Analysis

Karine dos Santos Evangelho[a] Carlos Cifuentes-González[b] William Rojas-Carabali[b] Clemencia De Vivero-Arciniegas[c] Mariana Cañas-Arboleda[d] Gustavo Salguero[d] Carolina Ramírez-Santana[e] Alejandra de-la-Torre[b]

[a]Doctoral Program Biomedical and Biological Sciences, School of Medicine and Health Sciences, University of Rosario, Bogota, Colombia; [b]Neuroscience (NEUROS) Research Group, Neurovitae Center for Neuroscience, Institute of Translational Medicine (IMT), School of Medicine and Health Sciences, University of Rosario, Bogota, Colombia; [c]Higher School of Ophthalmology Barraquer Institute of America, Bogota, Colombia; [d]Advanced Therapies Unit, Instituto Distrital de Ciencia Biotecnología e Innovación en Salud—IDCBIS, Bogota, Colombia; [e]Center for Autoimmune Diseases Research (CREA), Institute of Translational Medicine (IMT), School of Medicine and Health Sciences, University of Rosario, Bogota, Colombia

Downloaded from http://karger.com/ore/article-pdf/67/1/232/4218313/000538183.pdf by guest on 22 April 2024

Keywords
Glaucoma · Mesenchymal stromal cells · Cytokine · Human Wharton's jelly · Immune response

Abstract

Introduction: Glaucoma is a neurodegenerative disease characterized by the loss of retinal ganglion cells. Recent research suggests immunological changes such as cytokine imbalance may affect its pathophysiology. This implies that immunomodulation, like that of mesenchymal cells, could be a potential therapeutic avenue for this disease. However, the effects of intravitreal injections of human Wharton's jelly-derived mesenchymal stromal cells (hWJ-MSCs) on intraocular immune response have not been assessed in ocular hypertension (OH) models. ***Methods:*** We explored this by measuring cytokine levels and expression of other markers, such as glial fibrillary acidic protein (GFAP) and T cells, in 15 randomly divided New Zealand rabbits: G1: OH, G2: hWJ-MSCs, and G3: OH+hWJ-MSCs. We analyzed the aqueous humor (IL-6, IL-8, and TNF-α) and vitreous humor (IFN-γ, IL-10, and TGF-β) using ELISA and flow cytometry (cell populations), as well as $TCD3^+$, $TCD3^+/TCD4^+$, and $TCD3^+/TCD8^+$ lymphocytes, and GFAP in the retina and optic nerve through immunohistochemistry. ***Results:*** We found a decrease in TNF-α, IL-6, IFN-γ, IL-10, and IL-8 in G3 compared to G1 and an increase in TGF-β in both G2 and G3. $TCD3^+$ retinal infiltration in all groups was primarily $TCD8^+$ rather than $TCD4^+$ cells, and strong GFAP expression was observed in both the retina and optic nerves in all groups. ***Conclusion:*** Our results suggest that cellular and humoral immune responses may play a role in glaucomatous optic neuropathy and that intravitreal hWJ-MSCs can induce an immunosuppressive environment by inhibiting proinflammatory cytokines and enhancing regulatory cytokines.

© 2024 The Author(s).
Published by S. Karger AG, Basel

karger@karger.com
www.karger.com/ore

Karger
OPEN ACCESS

© 2024 The Author(s).
Published by S. Karger AG, Basel

This article is licensed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (CCBY-NC) (http://www.karger.com/Services/OpenAccessLicense). Usage and distribution for commercial purposes requires written permission.

Correspondence to:
Alejandra de-la-Torre, ligia.delatorre@urosario.edu.co

Introduction

Glaucoma is a chronic neurodegenerative disease of multifactorial origin characterized by the death of retinal ganglion cells and progressive visual field loss. Studies in the serum and aqueous humor of patients with glaucoma indicate upregulation of specific cytokines, such as IL-1, IL-8, IL-6, TGF-β, and TNF-α. These changes in cytokine expression suggest a potential association between the immune response and a chronic inflammation in the pathogenesis of glaucoma [1, 2].

Currently, no therapies are available to reverse glaucomatous neuronal degeneration [3], making the search for neuroprotective therapies a relevant field of study. Ocular stem cell research is particularly attractive because the eye is considered an immune-privileged organ, developing various molecular and cellular mechanisms that limit immune responses to preserve vision [4]. The ocular anatomy offers distinct advantages for cell-based therapy, such as the accessibility of the eye that facilitates the delivery of treatments. Additionally, the capacity for direct monitoring allows for immediate assessment and adjustment of therapeutic strategies, potentially improving treatment outcomes. Moreover, the localized nature of ocular interventions substantially reduces the probability of systemic side effects [5, 6].

Mesenchymal stem cell (MSCs) transplantation is emerging as a tool for neural regeneration [7] due to its anti-inflammatory and immunomodulatory properties related to its paracrine or endocrine effect [8]. These properties are based on mechanisms that inhibit immune cell proliferation and decrease the Th1 and Th17 response, inhibiting the production of proinflammatory cytokines, antibodies, and cytotoxic mediators [9–11], which could be related to glaucoma. MSCs exhibit limited antigenicity and secrete trophic factors, further highlighting their potential therapeutic applications [3, 12, 13].

MSCs isolated from extraembryonic tissues, such as human Wharton jelly-derived mesenchymal stromal cells (hWJ-MSCs), have some advantages compared to those derived from adult tissues, such as better proliferative capacity, lifespan, a more primitive cellular character without tumorigenicity, and low immunogenicity, with a lower probability of allogeneic and xenogeneic transplant rejection [3, 14]. Thus, MSCs are capable of going unnoticed by the immune system since the host does not generate any response to them, which allows the transplantation of these cells between species other than those from which the cells come from [15]. Studies provide evidence of the successful integration of xenogeneic cells in animal models to treat various human ocular diseases such as retinal holes and age-related macular degeneration [16, 17]. Immunological rejection related to the use of different species has not been documented; on the contrary, studies reported that the cells derived from humans did not provoke an immune response at the application site, which may be due to the immunosuppressive properties of the cells [18].

In addition, hWJ-MSCs can produce anti-inflammatory and neurotrophic factors that exert immunosuppressive activity. However, to exert this immunosuppressive effect, MSCs must be activated in an inflammatory environment; otherwise, they remain quiescent [19]. The use of hWJ-MSCs in an immunosuppressive environment as in the case of ocular hypertension (OH) caused by glucocorticoids (GCs) has not been studied previously.

The pathogenesis of glaucoma involves the infiltration of T cells into the retina, a process not yet fully understood in terms of the specific roles of different T-cell subsets. Some of these cells may initiate neurodegeneration characteristic of glaucoma, while others may act as effector cells in the disease process [20]. Given this complexity, MSCs offer a promising therapeutic strategy. Their ability to induce cell division arrest can potentially mitigate the impact of T-cell activity in the retina, addressing a key aspect of glaucomatous neurodegeneration [3, 19]. This study aimed to evaluate the effect of intravitreal application of hWJ-MSCs on the intraocular inmmune response of a glucocorticoid-induced OH model by measuring cytokine levels in the aqueous humor (IL-6, IL-8, and TNF-α) and vitreous humor (IFN-γ, IL-10, and TGF-β), as well as the T cell responses in the retina and optic nerve (ON).

Materials and Methods

The study included 15 New Zealand White male rabbits aged approximately 4 months and weighing 2–3 kg (online suppl. Fig. 1; for all online suppl. material, see https://doi.org/10.1159/000538183). The animals were housed according to NIH guidelines (online suppl. Fig. 2). All experimental and animal care procedures were conducted in accordance with the ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research and approved by the Animal Ethics Committee of Escuela Superior de Oftalmología Instituto Barraquer de América (CEIA-ESO-IBA), under reference C-20190226-1. In addition, all animals underwent a complete ocular examination to rule out the presence of ocular diseases, such as chronic keratitis or conjunctivitis of any etiology, dry eye syndrome, lens opacity, and systemic inflammatory disorders, before inclusion in this study. Ophthalmic examinations included IOP measurement using

Downloaded from http://karger.com/ore/article-pdf/67/1/232/4218313/000538183.pdf by guest on 22 April 2024

applanation tonometry (Tono-Pen AVIA Vet™/Reichert, Depew, NY, USA), slit-lamp biomicroscopy of the anterior segment (SL-15/Kowa, Tokyo, Japan), direct ophthalmoscopy (Welch Allyn, Skaneateles Falls, WA, USA), and indirect ophthalmoscopy (Vantage Plus binocular, Keeler, UK). Three intervention groups with 5 animals each were assigned as follows: group 1: OH; group 2: hWJ-MSCs; and group 3: OH+hWJ-MSCs. The untreated left eye was used as the control in all cases.

Anesthesia

For intravitreal injection of hWJ-MSCs, aqueous and vitreous humor collection, the animals were anesthetized with an intramuscular injection of ketamine (Ketafine®, Brouwer, Argentina) (35 mg/kg) and xylazine (Xilacina 2%, Erma, Colombia) (8 mg/kg). Anesthetic eye drops based on 0.5% proparacaine (Alcaine®, Alcon, Barcelona) were used before the subconjunctival GC injection. Artificial tears (Splash Tears, Sophia, Colombia) were administered daily to reduce possible complications of topical anesthesia. A daily ocular surface evaluation with a slit lamp was performed to detect possible corneal alterations associated with topical anesthesia.

Induction of OH and IOP Measurements

OH was induced in 10 eyes: G1 (5 eyes) and G3 (5 eyes). We used topical drops of prednisolone acetate (Prednefrin Forte® eye drops 10 mg/mL – Allergan, Brazil) applied twice a day, associated with subconjunctival injections of 0.5 mL of betamethasone acetate (Celestone Cronodose®, disodium phosphate, 3 + 3 mg/mL, Schering-Plough, Mexico) weekly in the right eye for 5 weeks to raise and maintain constantly elevated IOP [21, 22].

IOP was measured in both eyes using an applanation tonometer. Measurements were taken twice daily (at 7:00 a.m. and 4:00 p.m.) for all experimental animals across nine consecutive weeks. To obtain measurements, minimal head and neck restraint was applied to the animals to avoid excessive pressure on the eyelids and neck. Five readings were recorded for each eye and were averaged. The eye for starting the measurements was randomly selected and the same examiner conducted tonometry in all cases. Considering the normal IOP in rabbits, OH was considered when the readings were above 15 mm Hg [23].

Isolation and Culture of hWJ-MSCs

Human umbilical cord samples were collected from full-term births (caesarean and vaginal deliveries). Informed consent was approved by the Ethical Committee of Secretaria Distrital de Salud de Bogotá, and healthy donors signed it before collection under approval reference 2019EE44993. hWJ-MSCs were isolated as previously described [24, 25]. The umbilical cord fragments were washed with 0.9% saline solution containing 1% penicillin/streptomycin (10,000 U/mL), and the umbilical veins, arteries, and outer membranes were removed. Wharton's jelly was minced and cultured in flasks containing Dulbecco's Modified Eagle's medium low glucose (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), 1% penicillin/streptomycin (10,000 U/mL) and supplemented with 10% hPL plus 8 IU/mL of heparin. The hWJ-MSC cultures were maintained at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO2. Confluent cultures (80%) were harvested, and hWJ-MSCs were expanded to the third passage and used in subsequent experiments.

Quality Control of hWJ-MSCs

Quality control of hWJ-MSCs was immunophenotypically characterized by labeling the cells with antibodies against CD90-APC, CD73-PE/Cy7, CD105-PE, CD274-PE, CD45-APC/Cy7, CD34-PerCP-Cy5.5, and CD31-PE (BioLegend, San Diego, USA). Inhibition of $TCD3^+$ was evaluated. In addition, the cell suspension was analyzed for sterility, endotoxins, and mycoplasmas. Flow cytometry analyses were performed using a FACSCanto II™ instrument (*BD, Franklin Lakes, NJ, USA*), and data were analyzed using the FlowJo vX.7.0 software package (*TreeStar, USA*).

Intravitreal Injection of hWJ-MSCs

Animals from G2 and G3 received a single intravitreal injection of the hWJ-MSC suspension at week seven of the study. hWJ-MSCs were supplied in single-dose cryotube vials and thawed previously. After general anesthesia and under sterile conditions, the hWJ-MSC suspension (1×10^5cells/100 µL) [16] was gently injected into the vitreous cavity with a 30-gauge needle through the pars plana of the globe in the direction of the optic disc. An intravitreal injection of sterile balanced salt solution was then applied to the untreated eye.

Aqueous and Vitreous Humor Collection

After anesthesia, povidone-iodine was instilled for 5 min and then flushed with saline. Aqueous humor samples (0.1 mL) were aspirated through limbal paracentesis using a 1 mL syringe with a 30-gauge needle at weeks 1, 3, and 9. For collection of the vitreous humor, a 27 G needle was used, and it was introduced 4 mm from the temporal corneal limbus, crossing the sclera in the direction of the ON head. As a result, 0.7–0.9 mL of vitreous humor was aspirated.

Analysis of Cell Characteristics in the Aqueous and Vitreous Humor

The samples were immediately stored at 4°C and sent to the laboratory. Aqueous humor samples were centrifuged for 5 min at 700 rpm and analyzed by flow cytometry (*FACSCanto II™ flow cytometry, BD Biosciences™*) to discriminate cell populations by size and granularity at 1 week. At 1, 3 and 9 weeks, supernatant samples were collected for analysis. After identifying the cell population, leukocytes were stained with fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies specific for cell surface antigens: anti-CD3+ FITC (*anti-CD3 zeta antibody [H146-968] [FITC] [ab91493], Abcam, Cambridge, MA*) at 3 and 9 weeks. Analyses were performed using the software program FC EXPRESS 7 (*Cytosens*).

To measure the concentration of cytokines in the aqueous and vitreous humor, the supernatants of the previously centrifuged samples were thawed and analyzed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), according to the manufacturer's instructions. Cytokines measured in aqueous humor were as follows: IL-6 (*Low Sample Volume Rabbit Interleukin 6 [IL6], ELISA Kit,* abx052084, *Abbexa, Cambridge, UK*); IL-8 (*Rabbit Interleukin 8/IL8 [CXCL8], ELISA Kit, abx155079, Abbexa, Cambridge, UK*); TNF-α (*Rabbit TNF-α [Tumor Necrosis Factor Alpha], ELISA Kit, E-EL-RB0011, Elabscience, USA*) and in vitreous humor: IFN-γ (*Mouse IFN-γ, ELISA set, BD OptEIA, 555138, BD Biosciences, CA*); IL-10 (*Rabbit IL-10 [Interleukin 10], ELISA Kit, E-EL-RB0487*);

Downloaded from http://karger.com/ore/article-pdf/67/1/232/4218134/000538183.pdf by guest on 22 April 2024

and TGF-β (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay kit for Rabbit Transforming Growth Factor Beta 1 [TGF-β1], Uscn Life Science Inc., China*).

Immunohistochemistry

Animals were euthanized with an overdose of sodium pentobarbital (*Sigma-Aldrich®, 100 mg/kg, EUA*). The eyeballs were enucleated and marked with sutures to facilitate orientation in the dorsal and ventral areas. The eyecup was fixed in neutral-buffered 10% formalin for 24 h at room temperature. Tissues were embedded in paraffin, and 4-µm sections were cut through the ON. Immunohistochemistry was performed by deparaffinization of the retinal sections, followed by dehydration and antigen unmasking with TRS (pH 9, 1X) (*Dako^{MR} Target Retrieval Solution, High pH, 10x concentrate, Dako, EUA*). Endogenous peroxidase blocks were used, followed by incubation with the primary antibody. Washing was performed with TBS (*EnVision^{MR} FLEX Wash Buffer 20x, Dako, EUA*) and subsequent application of the secondary antibody. A second wash was performed, and the peroxidase-chromogen substrate was added (*EnVision^{MR} FLEX DAB+-Chromogen, Dako, EUA*). Counterstaining was performed using Mayer's hematoxylin. Subsequently, retinas were mounted flat on coverslips and examined under a light microscope. The markers used were acid fibrillar glial protein (GFAP) (*Rabbit Polyclonal GFAP Antibody, Novus Biologicals, NB300-141*), TCD3$^+$ (*ab11089, rat monoclonal to CD3 [CD3–12], 1:250; Abcam, Cambridge, MA*), TCD4$^+$ (*CD4 [GK1.5]: sc-13573; Santa Cruz Biotechnology, Inc.*), and TCD8$^+$ (*CD8 [UCH-T4]: sc-1181; Santa Cruz Biotechnology, Inc.*). Spleen was used as a positive control for T-lymphocyte labeling. Images of each section were analyzed. For the interpretation of immunostaining of retinal and ON sections for TCD3$^+$ cells and subpopulations, it was established as NIC: absence of T-cell infiltration and IC: presence of T-cell infiltration. Double-blind assessment techniques were used to reduce bias in histopathological studies.

Statistical Analyses

Data analysis was conducted using Jamovi version 2 (Jamovi, 2021). The results are presented as means, standard deviations, and interquartile ranges. The Shapiro-Wilk normality test was used to determine the distribution of continuous variables. Repeated-measures ANOVA was applied in cases of normal distribution, while Friedman ANOVA was used for non-normal distributions. If significant differences were detected using repeated-measures ANOVA and paired sample *t* test, post hoc analyses were carried out using the Tukey and Bonferroni tests. A check for the assumption of homoscedasticity was not necessary as this condition was consistently satisfied in our analysis.

Additionally, when statistically significant differences were identified in the Friedman ANOVA, the Durbin-Conover test was used to compare the groups. We employed one-way ANOVA or Kruskal-Wallis ANOVA to analyze the differences between the groups over the weeks based on the distribution. If one-way ANOVA revealed statistically significant differences, Levene's test for homoscedasticity was conducted. The post hoc analysis test type was determined based on the results (Tukey's test for equal variances and Games-Howell test for different variances). For the Kruskal-Wallis ANOVA, differences between groups were explored using the Dwass-Steel-Critchlow-Fligner test.

We utilized R 4.21 and GraphPad Prism (version 8) to analyze the data derived from immunohistochemistry. We conducted a categorical variable analysis to determine the frequency of TCD3$^+$, TCD4$^+$, TCD8$^+$, and GFAP infiltration in various retinal layers. Additionally, we employed the χ^2 test or Fisher's exact test to assess differences between groups, depending on the data distribution.

Results

Quality Control of hWJ-MSCs

hWJ-MSCs showed expression (≤80%) of antibodies such as CD90, CD73, CD105, and CD274, and absence of expression (≥2%) of CD45, CD34, CD31, and HLA-DR. The inhibitory capacity of TCD3$^+$ cells was ≤87%. The cells showed 99% viability and <0.45 EU/mL of endotoxin. The cells were free of mycoplasmas and other microorganisms (sterile cellular suspensions).

IOP and Ophthalmology Changes in the Experimental Model

The proposed experimental model produced early, consistent, and long-lasting hypertension even after drug discontinuation. hWJ-MSCs transplantation presented good safety profiles and few adverse events in the proposed experimental model.

The IOP significantly increased ($p < 0.001$, Kruskal-Wallis ANOVA) in G1 and G3 from week 3 of the study compared to that in the untreated eyes (online suppl. Table 1). The untreated eyes did not show significant differences between weeks ($p > 0.05$, Kruskal-Wallis ANOVA). The IOP in OD in the groups was G1: 25.22 ± 12.31 mm Hg [13.0–64.0], G2: 13.33 ± 3.32 mm Hg [7.0–25.0], and G3: 19.16 ± 4.47 mm Hg [11.0–42.0] at week 7. We observed a sudden increase in IOP in G1 compared with G3 after GC suspension at week 5 (online suppl. Table 1). In addition, all groups presented slightly higher IOP in the afternoon than in the morning. However, this was not significant, demonstrating that the animals were adequately acclimatized ($p > 0.05$, Kruskal-Wallis ANOVA).

A comprehensive ophthalmological examination was performed daily before and after the induction of OH to identify potential ophthalmological changes that could occur during the development of the proposed experimental model. No alterations were found in corneal curvature or irregularities in the corneal surface related to topical anesthesia.

During the 5 weeks of induction of OH, we did not observe damage at the level of the annexed organs of the eyeball or the presence of blepharospasm, epiphora, or

Downloaded from http://karger.com/ore/article-pdf/67/1/232/4218313/000538183.pdf by guest on 22 April 2024

Table 1. Analysis of the lymphocyte's percentage in aqueous humor, before and after the intravitreal injection of hWJ-MSCs, and induction of OH

	Lymphocytes, % cells/μL				*p* value*
	control, mean (SD) [IQR]	G1, mean (SD) [IQR]	G2, mean (SD) [IQR]	G3, mean (SD) [IQR]	
Week 1	4.8 (0.8) [3.8–5.7]	5.1 (0.5) [4.4–5.6]	4.0 (2.4) [0.0–5.9]	3.5 (2.1) [0.0–5.2]	0.434[1]
Week 3	4.9 (0.2) [4.7–5.1]	20.7 (2.1) [17.6–22.2]	5.4 (1.1) [3.8–7.0]	19.0 (3.5) [13.3–22.7]	**<0.001**[1*]
Week 9	5.0 (0.2) [4.8–5.2]	48.4 (22.1) [22.0–68.7]	32.0 (5.2) [27.3–38.5]	34.0 (14.1) [16.8–54.1]	**<0.001**[1*]
p value*	0.8352	**0.01**[2*]	<0.001[2*]	<0.001[2*]	

G1, OH; G2, hWJ-MSCs; G3, OH + hWJ-MSCs; SD, standard deviation; IQR, interquartile range. *$p < 0.05$. [1]ANOVA one way. [2]ANOVA repeated measures.

photophobia that could indicate pain or discomfort in groups G1 and G3. However, from week 7 of the study, after the application of hWJ-MSCs, one animal from G3 presented with intense conjunctival hyperemia, mild corneal edema, rubeosis iridis, and iritis, changing its clinical characteristics at week 9 (less conjunctival hyperemia, gray-green iris, and corneal edema). In G2, one animal showed mydriasis without a response to light stimulation at week 9. There were no signs of uveitis, bacterial infections, or any abnormalities after intravitreal application in the other animals studied.

T-Cell Infiltration in the Anterior Chamber

We observed a significant increase in the number of infiltrating cells in the aqueous humor in G1, G2, and G3 groups over time (Table 1). In the post hoc analysis, we observed an increase in lymphocytes in G1 compared to that in weeks 1 and 3 ($p = 0.001$, Tukey's test, and $p = 0.002$, Bonferroni). In G2, greater cellular infiltration was observed when comparing weeks 1 and 9 ($p = 0.007$, Tukey's test, and $p = 0.01$, Bonferroni) and weeks 3 and 9 ($p = 0.005$, Tukey's test, and $p = 0.008$, Bonferroni). The same was observed in G3 when comparing weeks 1 and 3 ($p = 0.006$, Tukey's test, and $p = 0.008$, Bonferroni) and weeks 1 and 9 ($p = 0.021$, Tukey's test, and $p = 0.03$, Bonferroni).

In addition, the percentage of lymphocytes at week 3 was significantly lower than that at week 9 in all groups (G1: $p = 0.01$; G2: $p = 0.001$; G3: $p = 0.02$) (Fig. 1a). In the post hoc analyses, when evaluating week 3, a significant increase in lymphocytes was observed in G1 and G3 (both $p < 0.001$) when compared with the untreated eyes. The same increase in cell infiltration was observed in G1 and G3 (both $p < 0.001$) compared to that in G2. At week 9, greater lymphocyte infiltration was also demonstrated in G2 and G3 ($p = 0.001$ and $p = 0.03$, respectively) than in the untreated eyes.

Upon identifying the cell population, a general marker of $TCD3^+$ cells was used to detect these cells in aqueous humor samples. We observed significant cell infiltration in all groups at weeks 3 and 9 compared with the untreated eyes, which was further analyzed using the *post hoc* analysis proposed by Games-Howell (Table 2). At week 3, we observed a lower infiltration of $TCD3^+$ in the untreated eyes than in G1 and G3 ($p = 0.031$ and $p = 0.009$, respectively). Lower $TCD3^+$ infiltration was also observed in G2 than in G1 and G3 ($p = 0.0313$ and $p = 0.009$, respectively). At week 9, a lower infiltration of $TCD3^+$ was observed in the untreated eyes than in G1 ($p < 0.001$) and G3 ($p = 0.041$). However, when evaluating cellular infiltration over time, we observed a significant increase only in G1 ($p < 0.001$) at week 9 compared to that at week 1. When comparing the percentage of $TCD3^+$ cells between weeks 3 and 9, we observed a lower infiltration of $TCD3^+$ lymphocytes in week 3 compared to week 9 in all the studies, with statistical significance (G1: $p = 0.04$; G2: $p = 0.002$; and G3: $p = 0.05$) (Fig. 1b).

Intravitreal hWJ-MSCs Influence the Levels of Cytokines in the Eyes with OH

In this analysis, a decrease in the secretion of specific cytokines TNF-α, IL-6, IFN-γ, IL-10, and IL-8 was evident in G3 compared to G1. Moreover, we observed an increase in TGF-β in vitreous humor after applying hWJ-MSCs. We also measured TNF-α, IL-8, and IL-6 levels in the aqueous humor and IFN-γ, TGF-β, and IL-10 in the vitreous humor. We observed an increase in TNF-α, IL-6, and TGF-β levels in the OH group between weeks 3 and 9 in G1 (Table 3). However, only TNF-α levels were significantly different ($p < 0.001$). At week 3, we did not observe significant differences in TNF-α, IL-6, and TGF-β

Downloaded from http://karger.com/oreliarticle-pdf/67/1/232/4218313/000538183.pdf by guest on 22 April 2024

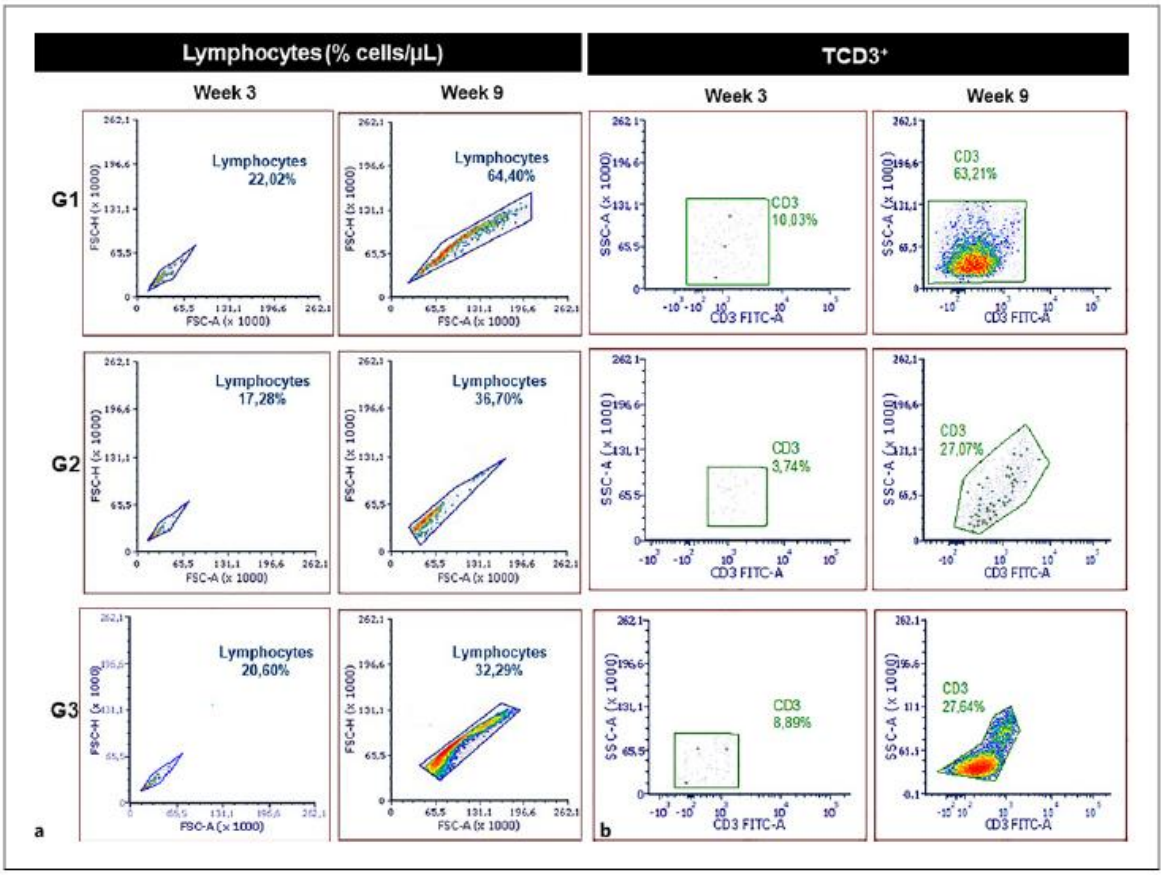


Fig. 1. Distribution of subsets of T cells *post*-OH, before and after the application of hWJ-MSCs at weeks 3 and 9. **a** Mononuclear cells isolated from aqueous humor samples were analyzed by multicolor flow cytometry for a general T-cell marker. The cytometer displays the following dot blot based on intrinsic cell characteristics: cell size and complexity, with a selected window for lymphocytes. **b** The percentages of $TCD3^+$ were significantly lower in the groups treated with hWJ-MSCs than in the untreated group. G1, OH; G2, hWJ-MSCs; G3, OH + hWJ-MSCs.

Table 2. Analysis of $TCD3^+$ lymphocyte's percentage during the follow-up time between groups

	$TCD3^+$ lymphocyte's, % cells/µL				*p* value*
	control, mean (SD) [IQR]	G1, mean (SD) [IQR]	G2, mean (SD) [IQR]	G3, mean (SD) [IQR]	
Week 3	4.3 (0.3) [3.9–4.6]	14.8 (3.7) [10.0–18.1]	5.0 (1.0) [3.7–6.1]	15.2 (3.7) [10.6–18.9]	**0.002**[1*]
Week 9	4.1 (0.6) [3.2–4.7]	44.0 (21.7) [18.2–63.2]	23.9 (3.4) [18.9–27.1]	29.6 (13.2) [15.7–48.5]	<**0.001**[1*]
p value*	0.103[2]	<**0.001**[2*]	0.078[2]	0.634[2]	

G1, OH; G2, hWJ-MSCs; G3, OH + hWJ-MSCs; SD, standard deviation; IQR, interquartile range. *$p < 0.05$. [1]ANOVA one-way. [2]Student *t* test for repeated measures.

Downloaded from http://karger.com/oretarticle-pdf/67/1/232/4218313/000538183.pdf by guest on 22 April 2024

Table 3. Analysis between changes in cytokines at weeks 3 and 9 in G1

	Week 3, mean (SD) [IQR]	Week 9, mean (SD) [IQR]	*p* value*
TGF-β, pg/mL	30.5 (2.0) [28.2–32.3]	38.5 (20.4) [8.9–54.1]	0.518
TNF-α, pg/mL	21.6 (3.1) [18.4–25.8]	48.5 (0.3) [48.0–48.7]	<**0.001***
IL-6, pg/mL	18.3 (1.1) [17.0–19.6]	20.8 (3.6) [16.8–25.4]	0.333

ANOVA one way; ELISA analysis. G1, OH; SD, standard deviation; IQR, interquartile range; TGF-β, transforming factor beta; TNF-α, tumor necrosis factor-alpha; IL-6, interleukin-6. *$p < 0.05$.

levels between G1, G2, and G3 and the untreated eyes (Table 4). However, an incremental non-significant trend for these cytokines was observed in G1 and G3 compared to untreated eyes but not in G2.

On evaluation of aqueous humor samples at week 9 (Table 5) (Fig. 2a), we observed that G1 and G2 significantly increased the levels of TNF-α ($p = 0.029$), whereas G3 reduced it by 22.54% compared to the untreated eyes. In addition, we found that G1 had significantly higher levels of this cytokine than G2 and G3 ($p < 0.001$). In the post hoc analysis, significant differences in TNF-α levels were found between the untreated eyes and all other groups ($p < 0.001$).

All groups showed a non-significant increase in IL-8 levels compared to the untreated eyes ($p = 0.06$), without significant differences between the groups. IL-6 levels increased in G2 ($p = 0.06$) and decreased in G3 ($p = 0.06$) compared to those in the untreated eyes; however, both trends were not significant. In the post hoc analysis, we observed an increase in IL-6 in G1 compared to that in the untreated eyes ($p = 0.04$) and G3 ($p = 0.005$).

At week 9, we found a non-significant increase in IFN-γ levels in the vitreous humor of G1 ($p > 0.05$) compared to the untreated eyes and a reduction in G2 and G3 (both $p = 0.03$) (Table 5) (Fig. 2b). No significant changes in TGF-β levels were observed in the groups compared to the untreated eyes. The concentration of TGF-β increased in the G3 group with respect to G1 and G2 groups, but the difference was not statistically significant. All groups showed significantly lower levels of IL-10 than the untreated eyes ($p < 0.05$). However, when comparing the groups, a significant reduction in the levels of this cytokine was observed in G2 compared to G1 ($p = 0.02$).

IOP Elevation Induces T-Cell Infiltration into the Retina and ON

When evaluating the infiltration of $TCD3^+/TCD4^+$ in the ganglion cell layer (GCL), it was observed that G3 presented infiltration, unlike G1, which did not present cellular infiltration. The retinal infiltration of $TCD3^+$ in all groups tended to belong more to the subpopulation of $TCD8^+$ cells than to $TCD4^+$ cells in various layers of the retina in the proposed experimental model. Likewise, all study groups showed strong GFAP expression in the retina and ON.

When evaluating the infiltration of $TCD3^+$ cells (Fig. 3a, 4a, b, c) in GCL, we observed that the only group that did not show cellular infiltration was G3, which was significant when compared to G1 ($p = 0.047$). Regarding the inner nuclear layer (INL) analysis, all groups exhibited infiltration, with no significant differences between the groups. When analyzing the ON, the G2 and G3 groups presented less $TCD3^+$ infiltration than the untreated eyes, which was statistically significant ($p = 0.037$). Additionally, G1 showed greater cellular infiltration than G2 and G3 ($p = 0.007$).

When evaluating $TCD3^+/TCD4^+$ cells (Fig. 3b, 4d, e, f), no evidence of infiltration was observed in the GCL, except for 1 case in G2. In the INL analysis, infiltration was mainly observed in G2 and G3, but no statistically significant differences were found. In the ON analysis, statistically significant differences were observed when comparing $TCD4^+$ infiltration, which was lower in the G2 and G3 groups than in the untreated eyes ($p = 0.037$ in both cases).

Regarding the $TCD3^+/TCD8^+$ analysis (Fig. 3c, 4g, h, i), the GCL in G1 exhibited higher infiltration than that in the untreated eyes ($p = 0.002$) and G2 and G3 ($p = 0.047$, for both). In the INL analysis, all groups showed a high infiltration of $TCD8^+$ without significant differences between the groups. In the ON analysis, low infiltration was observed, which was higher in the untreated eyes and G1 but without significant differences compared to the other groups.

Significant expression of GFAP (Fig. 3d, 4j, k, l) was observed in the GCL in G1 ($p = 0.002$), G2 ($p = 0.002$), and G3 ($p < 0.0001$) compared to that in the untreated eyes. When analyzing the INL, there was a significant

Downloaded from http://karger.com/ore/article-pdf/67/1/232/4218813/000538183.pdf by guest on 22 April 2024

Table 4. Intergroup analysis of cytokines at week 3

	Control, mean (SD) [IQR]	G1, mean (SD) [IQR]	G2, mean (SD) [IQR]	G3, mean (SD) [IQR]	*p* value*
TGF-β, pg/mL	27.4 (0.7) [26.9–27.9]	30.5 (2.0) [28.2–32.3]	24.8 (4.1) [21.8–27.7]	30.7 (2.5) [28.9–32.5]	0.275
TNF-α, pg/mL	15.6 (0.6) [15.1–16.0]	21.6 (3.1) [18.4–25.8]	14.7 (3.8) [12.0–17.4]	21.4 (2.1) [19.9–22.9]	0.128
IL-6, pg/mL	15.4 (0.7) [14.9–15.9]	18.3 (1.1) [17.0–19.6]	16.1 (2.2) [14.6–17.7]	19.5 (0.6) [19.0–19.9]	0.069

ANOVA one way; ELISA analysis. G1, OH; G2, WJ-MSC; G3, OH + hWJ-MSCs; SD, standard deviation; IQR, interquartile range; TGF-β, transforming factor beta; TNF-α, tumor necrosis factor-alpha; IL-6, interleukin-6. *$p < 0.05$.

Table 5. Intergroup analysis of cytokines at week 9

Cytokines	Control, mean (SD) [IQR]	G1, mean (SD) [IQR]	G2, mean (SD) [IQR]	G3, mean (SD) [IQR]	*p* value*
IFN-γ, pg/mL	97.7(37.6) [53.0–134.7]	971.9 (657.3) [249.5–1,688.1]	67.4 (42.7) [19.4–123.2]	164.9 (77.5) [120.2–280.7]	0.096
TGF-β, pg/mL	22.9 (11.3) [6.7–32.0]	38.5 (20.4) [8.9–54.1]	29.0 (20.6) [2.0–49.8]	50.3 (23.2) [33.3–83.7]	0.309
IL-6, pg/mL	14.5 (3.3) [10.4–18.4]	20.8 (3.6) [16.8–25.4]	17.9 (1.9) [15.4–20.0]	12.0 (2.7) [9.2–15.2]	**0.031***
IL-8, pg/mL	188.4 (228.0) [66.2–530.0]	368.7 (369.5) [58.8–888.8]	541.2 (764.7) [98.8–1,683.8]	324.1 (258.2) [82.5–690.0]	0.756
TNF-α, pg/mL	17.1 (0.4) [16.5–17.3]	48.5 (0.3) [48.0–48.7]	44.0 (1.6) [41.9–45.5]	13.2 (0.7) [12.6–14.2]	**<0.001***
IL-10, pg/mL	9.6 (0.7) [8.7–10.2]	11.4 (0.1) [11.3–11.6]	8.6 (0.8) [7.6–9.6]	9.6 (2.1) [6.9–11.9]	**0.003***

ANOVA one way; ELISA analysis. G1, OH; G2, hWJ-MSCs; G3, OH + hWJ-MSCs; SD, standard deviation; IQR, interquartile range; INF-γ, interferon-gamma; TGF-β, transforming factor beta; TNF-α, tumor necrosis factor-alpha; IL-6, interleukin-6; IL-8, interleukin 8; IL-10, interleukin 10. *$p < 0.05$.

GFAP expression in G3 ($p < 0.0001$) compared to that in the untreated eyes. G1 and G2 also showed expression but did not reach statistical significance when compared. Finally, the ON analysis showed evidence of GFAP expression in all groups in 100% of cases.

Discussion

In this study, we observed that therapy with hWJ-MSCs fostered an immunosuppressive environment in an experimental OH model produced by GCs by inhibiting proinflammatory cytokines and producing regulatory cytokines, such as TGF-β. Moreover, our experimental model showed predominant lymphocyte infiltration of $TCD3^+/TCD8^+$ cells in GCL, suggesting that cellular immunity, specifically by cytotoxic lymphocytes, could play a role in glaucomatous optic neuropathy in this animal model. However, this specific $TCD3^+$-/$TCD8^+$-cell infiltration was not observed in the groups treated with the cell therapy. Moreover, the evaluation of the INL showed not only infiltration of both $TCD3^+/TCD4^+$ and $TCD3^+/TCD8^+$ cells, but also strong GFAP expression, suggesting activation of the immune system in the studied groups. This is the first study to describe that intravitreal application of hWJ-MSCs can exert immunomodulatory effects on the ocular microenvironment in vivo in an animal OH model produced with GCs.

To carry out the OH experimental model, we use cell transplantation between different species. In this regard, we did not observe signs of clinical rejection after intravitreal transplantation of hWJ-MSCs, which leads us to think that in addition to the eye being considered an immunoprivileged site [26], the cells applied to the vitreous managed to remain alive *post*-transplant, promoting an additional immunosuppressive effect, avoiding rejection after transplantation in the experimental model of glaucoma within a few weeks of the study. We cannot rule out that an additional immunosuppressive effect

Downloaded from http://karger.com/ore/article-pdf/67/1/232/4218313/000538183.pdf by guest on 22 April 2024

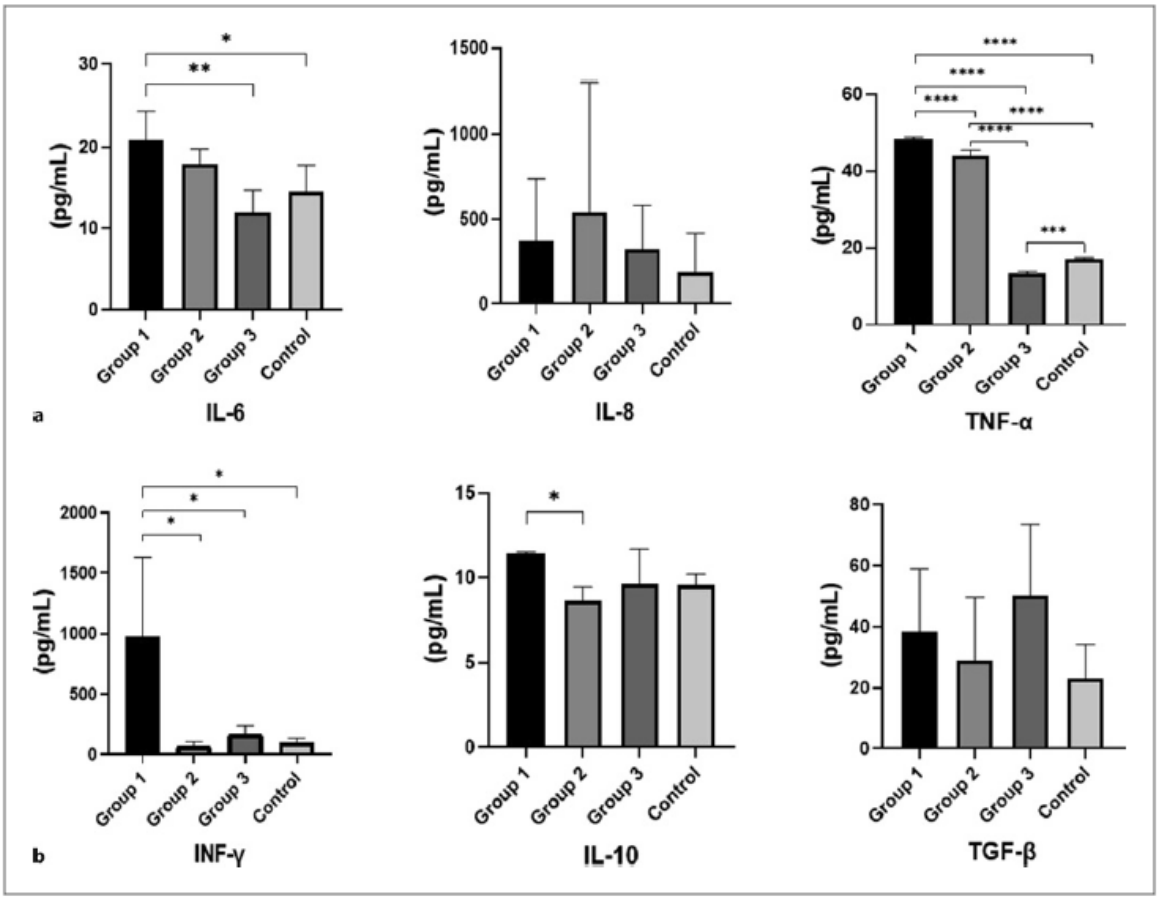


Fig. 2. Comparison of cytokines between the groups studied at week 9. **a** Cytokines in aqueous humor. **b** Cytokines in vitreous humor. ELISA analysis. G1, OH; G2, hWJ-MSCs; G3, OH + hWJ-MSCs. Control, untreated eye. Statistical test, ANOVA one way. INF-γ, interferon-gamma; TGF-β, transforming factor beta; TNF-α, tumor necrosis factor-alpha; IL-6, interleukin-6; IL-8, interleukin 8; IL-10, interleukin 10. $^{*}p < 0.05$.

occurred since this was a model produced by GCs, even though the medications were discontinued.

At this point, one might wonder if we could observe any post-intravitreal transplant effects in just 2 weeks of study. In this sense, we corroborate with the study published in 2011, which observed changes in the retina of rabbits after 4 days of the application of human MSCs in the vitreous [16] and Bull et al. [27] who describe the ability of intraocular cells to survive in vivo and respond to their environment over a period of 2–3 weeks. The therapeutic effect time has not been established. However, prior studies have noted that these cells sustain improvements in macular hole thickness for up to 32 days [16] and retinal degeneration for approximately 70 days [28]. The current study observed immunomodulatory effects up to week 9 (56 days). However, the long-term impacts beyond this period remain unexplored due to the absence of further follow-up. Extended observation could yield additional insights into the behavior of these cells within the intraocular environment. The mechanism by which GCs increase IOP is not completely understood. However, studies have shown that the continuous use of topical GCs for 4 weeks induces the accumulation of glycosaminoglycan material in the trabecular meshwork, altering the extracellular matrix [29]. Moreover, GCs induce the activation and overexpression of TGF-β, with the

Downloaded from http://karger.com/ore/article-pdf/67/1/232/4218313/000538183.pdf by guest on 22 April 2024

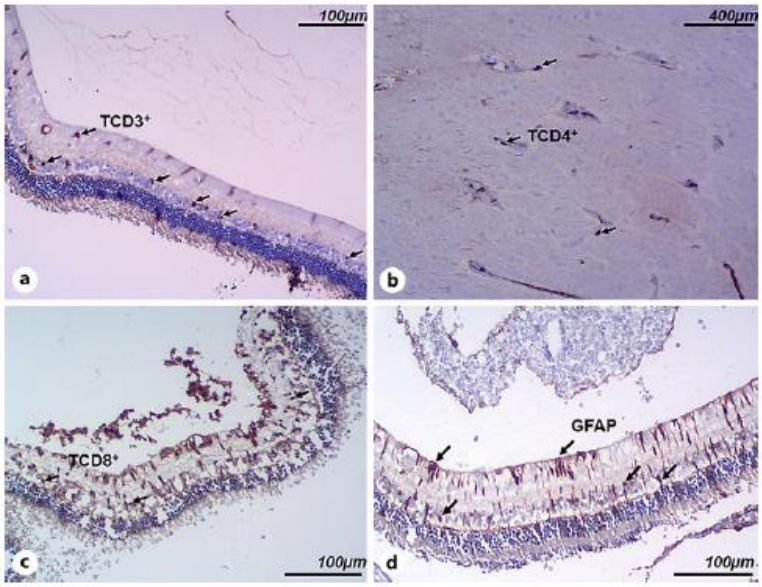


Fig. 3. Immunohistochemistry: New Zealand rabbit retinal immunostaining at week 9. **a** TCD3$^+$ cells positive immunostaining in the GCL and INL. **b** TCD4$^+$ cells positive immunostaining in ON. **c** TCD8$^+$ cells positive immunostaining in the INL. **d** GFAP expression in GCL and INL.

consequent inhibition of phagocytic activity in the anterior chamber [30], an increase in MMP-9, the formation of fibrosis, and consequently an increase in IOP [31–33].

The elevation of IOP in the posterior segment of the eye can lead to compression of the blood vessels and ON fibers. This in turn triggers axonal degeneration and apoptosis [34]. Beyond axonal changes, OH results in a diminished supply of neurotrophins [35]. This deficiency can lead to inadequate removal of glutamate from the extracellular space, which could represent an interaction whereby glial cell activation may play a dual role: on the one hand, they can provide support and have cell-protective capabilities [36], and can induce retinal ganglion cell death by secreting proinflammatory cytokines such as TNF-α and IL-1β [37].

As a result of glial cell activation and an elevation in vascular endothelial growth factor and intercellular adhesion molecule 1 (ICAM 1) in the retina, T-lymphocyte infiltration occurs through the retinal pigment epithelium. Although activated microglia control the transition from innate immunity to an adaptive immune response in the nervous system, it is not clear what is the cause and what is classified as an epiphenomenon for the manifestation of an autoimmune disease in glaucoma [38, 39]. In our study, the infiltration of intraocular T cells could be altered by the proposed model of OH, due to the dual effects of corticosteroids: on the one hand inducing IOP increase and on the other suppressing immune responses [40]. However, we observed not only an infiltration of T cells in the anterior segment in the OH groups, but also an increase in the levels of certain proinflammatory cytokines in both the aqueous and vitreous humors, suggesting that this experimental model can present paradoxical inflammation as a response to the alteration of intraocular homeostasis despite the immunosuppressive action of GCs.

Although T-cell-mediated immune responses may be beneficial and even necessary to optimally limit neurodegeneration within the central nervous system [41], the presence of lymphocytes may induce the recruitment of more circulating lymphocytes [29], as evidenced in our investigation. This observation may be due to the activation of residual macrophages and induction of the expression of IL-6 (dual action, proinflammatory, and anti-inflammatory), IL-1β, and TNF-α (proinflammatory) [33, 42, 43]. Even so, the overexpression of T lymphocytes could also be explained by the intravitreal application of hWJ-MSCs, which produce an active intraocular immune response in an effort to maintain homeostasis of the ocular microenvironment [44].

A significant increase in TCD3$^+$ cells was also observed compared to the eyes of the untreated eyes in the group treated with hWJ-MSCs without OH, suggesting that these cells not only produce inhibitory effects on T cells, but also have a stimulatory effect on some lymphocyte strains. An interesting finding in our experimental model was the presence of TCD3$^+$-cell

Downloaded from http://karger.com/ore/article-pdf/67/1/232/4218813/000538183.pdf by guest on 22 April 2024

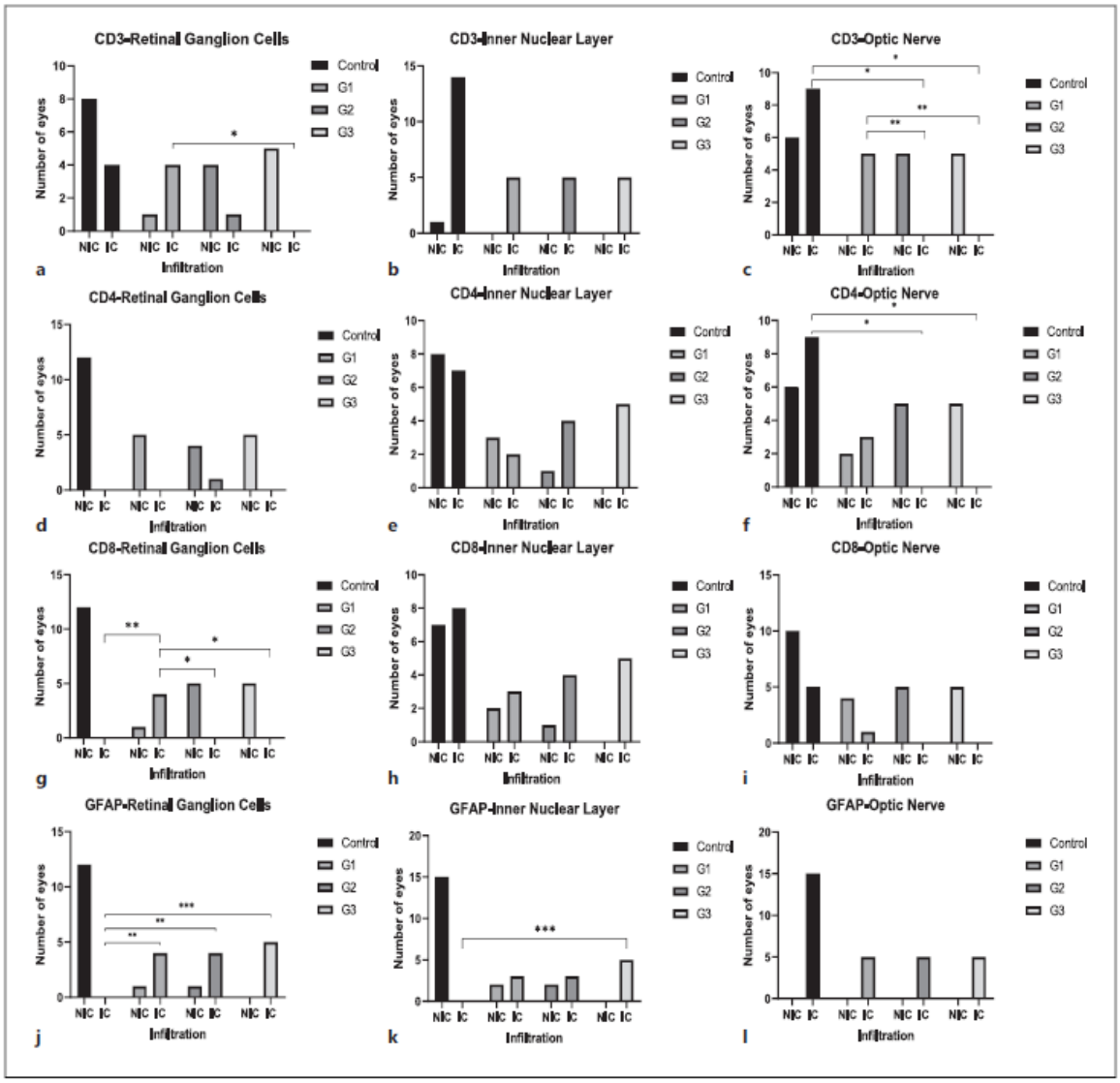


Fig. 4. Infiltration of lymphocytes in the retina and ON. **a–c** $TCD3^+$ (cluster of differentiation 3). **d–f** $TCD4^+$ (cluster of differentiation 4). **g–i** $TCD8^+$ (cluster of differentiation 8). **j–l** GFAP (glial fibrillary acidic protein). NIC, absence of T-cell infiltration; IC, presence of T-cell infiltration. All the analyses were done with the Chi or Fisher tests, depending on the data distribution. $^*p < 0.05$.

infiltration in some retinal layers in the untreated eyes. Cellular infiltration has also been described in glaucoma models [45, 46].

We observed that GC-induced OH could also increase the concentrations of IL-6, IL-8, TNF-α, IL-10, and IFN-γ in both the aqueous and vitreous humors, as described in other forms of glaucoma [47–49]. We corroborated the findings of Yang et al. [50] by observing an increase in TGF-β levels in the OH group, suggesting that the increase in this cytokine may be the triggering factor

Downloaded from http://karger.com/ore/article-pdf/67/1/232/4218313/000538183.pdf by guest on 22 April 2024

for the imbalance of certain cytokines in the ocular microenvironment.

The elevated concentrations of certain cytokines in glaucoma might be attributable to the activation of microglia, as indicated by the observed gliosis and GFAP overexpression in the OH groups. The activation of microglia is known to trigger the release of proinflammatory cytokines, such as TNF-α, IL-1β, and IL-6 [51]. Among these cytokines, the levels of IL-6, TNF-α, and IFN-γ decreased following the application of hWJ-MSCs in the OH group when compared to the group without cell therapy. This suggests that soluble factors secreted by MSCs may exert an immunomodulatory effect. Many of the factors produced by MSCs can inhibit Th1 lymphocytes and reduce IFN-γ and TNF-α levels [52]. Furthermore, these factors can promote the expansion of Tregs (highlighted by the markers TGF-β and IL-10) and Th2 [53], thus modulating the ocular microenvironment.

The literature suggests that hWJ-MSCs may express a higher level of immunomodulatory factors, such as TGF-β, than adult bone marrow-derived MSCs [53]. Other authors postulate that the suppressive effect of MSCs is particularly due to factors such as TGF-β1, IL-10, and IL-6 [11, 54–56]. In our study, we observed a lower concentration of TGF-β in the OH group than in the group that received cell transplantation. This indicates that hWJ-MSCs are capable of secreting factors that provide regenerative and restorative effects that inhibit the inflammatory reaction of cells in the ocular microenvironment [57, 58].

Contrary to what was observed by Mrahleh et al. [59] in an in vitro study of hWJ-MSCs, no increase in IL-10 concentration was observed in the cell therapy groups. However, this cytokine increased slightly in the OH group than in the untreated eyes. This increase in IL-10 associated with the increase in IL-6 has been described in POAG and may serve as an early biomarker of disease progression [56, 60]. The same tendency to increase IFN-γ levels was observed in the OH group compared with those treated with hWJ-MSCs. This finding can be attributed to the secretion of soluble factors involved in the immunosuppressive mechanisms of MSCs, such as IDO, which exerts an inhibitory effect on signal transduction in Th1 lymphocytes and is involved in the production of proteins necessary for the proliferation of lymphocytes [61].

One of the main cytokines altered in glaucomatous processes is TNF-α [62]. TNF-α is usually found in healthy eyes [63], explaining its presence in our study's untreated eyes. In addition, we observed that the OH group without hWJ-MSCs and the cell therapy group without OH significantly increased the concentration of this cytokine. This increase can be observed in stressful situations such as immune reactions, inflammation, ischemia, hypoxia, and oxidative stress [64]. In contrast, the OH group that received hWJ-MSCs showed a decrease in the level of this cytokine, which is consistent with other reports [59]. These findings demonstrated the potential immunomodulatory effects of these cells.

In our study, we observed an increase in IL-8 levels in all groups compared with that in the untreated eyes. This observation may be due to the characteristics of IL-8, a proinflammatory cytokine with proangiogenic, proliferative, and promotility activities, indicating neuroinflammation in the presence of elevated levels [69]. IL-6 is a cytokine with proinflammatory and anti-inflammatory characteristics, which could explain the increase in IL-6 after intravitreal application of hWJ-MSCs in the group without OH. A significant decrease in this cytokine was observed in the OH group that received cell therapy but not in the OH group. This alteration in the ocular microenvironment may be related to the anti-inflammatory property of hWJ-MSCs because of the suppression of the production of IL-6 and a reduction in the activation of circulating monocytes, causing the inhibition of some cytokines [70].

Currently, it has been hypothesized that glaucoma is an autoimmune disorder since the presence of antibodies against endogenous antigens [65] and T cells has been detected in glaucoma patients. The presence of T cells in the retina is unusual because the eye has barriers that prevent their entry [20]. However, as some authors have described in other OH models [20], we also observed infiltration of $TCD3^+$ cells in the retina, even in an immunosuppressed environment, owing to applying GCs.

When evaluating $TCD3^+$-/$TCD4^+$-cell infiltration, we observed infiltration of the INL in all groups, including the untreated eyes. The hWJ-MSC group without OH was the only group with $TCD4^+$-cell infiltration in the GCL. This may be due to the immunomodulatory effect of MSCs through the activation of immunoregulatory cells such as tolerogenic dendritic cells and regulatory T cells, which are capable of inhibiting antigen-specific T-cell responses [59].

In contrast to the results described by Yan et al. [56] in peripheral blood samples from glaucoma patients, in our study, we observed a significantly higher percentage of $TCD8^+$-cell infiltration in various layers of the retina

Downloaded from http://karger.com/ore/article-pdf/67/1/232/4218313/000538183.pdf by guest on 22 April 2024

compared to untreated eyes. A promising finding was that when evaluating the GCL, we observed that the only group that presented an intense infiltration of $TCD8^+$ cells in this layer of the retina was the OH group. This finding may indicate that cellular immunity also plays an essential role in the initiation and/or progression of glaucomatous optic neuropathy [47]. These observations justify further studies to determine the importance of T-cell responses in neuroinflammation and neurodegeneration in glaucoma.

In the retina, both Müller cells and astrocytes and glial cells play an important role in retinal tissue homeostasis, regulating the immune response in the central nervous system [66]. In the early stages of glaucoma, glial cells undergo gliosis in response to an increased IOP. However, in chronic diseases, proliferative gliosis can accelerate neurodegeneration through the secretion of proinflammatory cytokines, increasing the inflammatory reaction and activating the apoptotic pathway [67, 68]. In our study, we assumed that the intravitreal application of hWJ-MSCs was capable of triggering a transient but massive infiltration of cells with Iba1+ markings (a protein highly expressed in microglia and macrophages) from the choroid to the retina, capable of altering the retinal structure [3]. We observed intense activation of glial cells, marked by the expression of GFAP, in the group of hWJ-MSCs without OH. Furthermore, intense GFAP expression was observed not only in the GCL, but also in the INL, and the ON was observed in all animals. This indicates that even without presenting toxic properties to the retina and ON, the transplant is not innocuous because it triggers the expression of GFAP in the group without OH with cell therapy.

One of the limitations of our study was the small sample size, which can reduce the statistical power. Another limitation was that we did not evaluate other cell populations, such as granulocytes and monocytes, in the aqueous and vitreous humor samples, which could be related to disease development. Some of the aqueous humor and vitreous humor samples from the first week of the study were lost due to misreading of the ELISA kits, reducing the number of cytokines evaluated at that time and consequently the sample size, which could influence the statistical analysis results of the study. Obtaining cytokine kits for rabbits was a challenge in addition to the limited collection of intraocular fluids. Although many antibodies originate in rabbits, there are not many antibodies with reactivity for this species. The initial idea was to use microarray kits to measure various cytokines, but the market lacks the production of these kits for the species studied, only for other species. For this reason, ELISA kits were randomly divided to be used between aqueous humor and vitreous humor.

Conclusion

Our study demonstrated that the intravitreal xenotransplantation of hWJ-MSCs promotes increased anti-inflammatory cytokine production while suppressing proinflammatory cytokine production in the ocular microenvironment of an experimental OH model induced by GCs. Moreover, even within this OH-immunosuppressed context, we noted predominant infiltration of $TCD3^+/TCD8^+$ lymphocytes in the retina. However, this infiltration decreased in animals subjected to cell therapy. These observations support that glaucomatous disease is not merely characterized by OH but also presents as an immune-mediated disorder resulting in T-cell infiltration into the retina. Therefore, the transplantation of hWJ-MSCs has emerged as a promising therapeutic option. These cells appear to modulate intraocular homeostasis, which may help delay disease progression.

Statement of Ethics

All procedures performed in this study were approved by the Animal Ethics Committee Escuela Superior de Oftalmología Instituto Barraquer de América (CEIA-ESO-IBA), letter C-20190226-1, dated 2019-02-26, and were in accordance with the Helsinki Declaration (1964) and its later amendments. This study protocol was reviewed and approved by the Ethical Committee of Secretaria Distrital de Salud de Bogotá, under approval reference 2019EE44993. Written informed consent in this study was obtained from all participants and from parents/legal guardians for all participants aged under 18. This study was conducted ethically in accordance with the World Medical Association Declaration of Helsinki.

Conflict of Interest Statement

The authors have no conflicts of interest to declare.

Funding Sources

This study was supported by the Universidad del Rosario, Colombia, and the Escuela Superior de Oftalmología del Instituto Barraquer de América, Colombia.

Downloaded from http://karger.com/ore/article-pdf/67/1/232/4218134/000538183.pdf by guest on 22 April 2024

Author Contributions

Karine dos Santos Evangelho: investigation, methodology, visualization, and writing – original draft. Carlos Cifuentes-González: data analyses and writing – review and editing; William Rojas-Carabali: data interpretation and writing – review and editing; Clemencia De Vivero-Arciniegas: investigation and methodology; Mariana Cañas-Arboleda and Gustavo Salguero: methodology; Carolina Ramírez-Santana: writing – review and editing; and Alejandra de-la-Torre: project administration, investigation, and writing – review and editing. All authors have read and approved the final manuscript.

Data Availability Statement

All data generated or analyzed during this study are included in this article and its online supplementary material files. Further inquiries can be directed to the corresponding author.

References

1 Wong M, Huang P, Li W, Li Y, Zhang SS, Zhang C. T-helper1/T-helper2 cytokine imbalance in the iris of patients with glaucoma. PLoS One. 2015;10(3):e0122184. doi: 10.1371/journal.pone.0122184.

2 Husain S, Abdul Y, Webster C, Chatterjee S, Kesarwani P, Mehrotra S. Interferon-gamma (IFN-γ)-mediated retinal ganglion cell death in human tyrosinase T cell receptor transgenic mouse. PLoS One. 2014;9(2):e89392. doi: 10.1371/journal.pone.0089392.

3 Millán-Rivero JE, Nadal-Nicolás FM, García-Bernal D, Sobrado-Calvo P, Blanquer M, Moraleda JM. Human Wharton's jelly mesenchymal stem cells protect axotomized rat retinal ganglion cells via secretion of anti-inflammatory and neurotrophic factors. Sci Rep. 2018;8(1):16299. doi: 10.1038/s41598-018-34527-z.

4 Hiroshi K, Shintaro H, Sunao S. Immune Privilege and Eye-Derived T-Regulatory Cells. J Immunol Res. 2018;2018:1679197. doi: 10.1155/2018/1679197.

5 Coulon SJ, Schuman JS, Du Y, Bahrani Fard MR, Ethier CR, Stamer WD. A novel glaucoma approach: stem cell regeneration of the trabecular meshwork. Prog Retin Eye Res. 2022;90:101063. doi: 10.1016/j.preteyeres.2022.101063.

6 Roubeix C, Godefroy D, Mias C, Sapienza A, Riancho L, Degardin J, et al. Intraocular pressure reduction and neuroprotection conferred by bone marrow-derived mesenchymal stem cells in an animal model of glaucoma. Stem Cell Res Ther. 2015;6(1):177. doi: 10.1186/s13287-015-0168-0.

7 Uccelli A, Benvenuto F, Laroni A, Giunti D. Neuroprotective features of mesenchymal stem cells. Best Pract Res Clin Haematol. 2011;24(1):59–64. doi: 10.1016/j.beha.2011.01.004.

8 Le Blanc K, Ringdén O. Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation. Biol Blood Marrow Transplant. 2005;11(5):321–34. doi: 10.1016/j.bbmt.2005.01.005.

9 Zhang B, Liu R, Shi D, Liu X, Chen Y, Dou X, et al. Mesenchymal stem cells induce mature dendritic cells into a novel Jagged-2–dependent regulatory dendritic cell population. Blood. 2009;113(1):46–57. doi: 10.1182/blood-2008-04-154138.

10 Kou M, Huang L, Yang J, Chiang Z, Chen S, Liu J, et al. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles for immunomodulation and regeneration: a next generation therapeutic tool? Cell Death Dis. 2022;13(7):580–16. doi: 10.1038/s41419-022-05034-x.

11 Ren G, Zhang L, Zhao X, Xu G, Zhang Y, Roberts AI, et al. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. Cell Stem Cell. 2008;2(2):141–50. doi: 10.1016/j.stem.2007.11.014.

12 Sánchez-Berná I, Santiago-Díaz C, Jiménez-Alonso J. Acción inmunomoduladora de las células madre mesenquimales en las enfermedades autoinmunitarias. Med Clin. 2015;144(2):88–91. doi: 10.1016/j.medcli.2014.01.014.

13 Ranjbaran H, Abediankenari S, Mohammadi M, Jafari N, Khalilian A, Rahmani Z, et al. Wharton's jelly derived-mesenchymal stem cells: isolation and characterization. Acta Med Iran. 2018;56(1):28–33.

14 Joerger-Messerli MS, Marx C, Oppliger B, Mueller M, Surbek DV, Schoeberlein A. Mesenchymal stem cells from Wharton's jelly and amniotic fluid. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol. 2016;31:30–44. doi: 10.1016/j.bpobgyn.2015.07.006.

15 Grinnemo KH, Månsson A, Dellgren G, Klingberg D, Wardell E, Drvota V, et al. Xenoreactivity and engraftment of human mesenchymal stem cells transplanted into infarcted rat myocardium. J Thorac Cardiovasc Surg. 2004;127(5):1293–300. doi: 10.1016/j.jtcvs.2003.07.037.

16 Xuqian W, Kanghua L, WeiHong Y, Xi Y, Rongping D, Qin H, et al. Intraocular transplantation of human adipose-derived mesenchymal stem cells in a rabbit model of experimental retinal holes. Ophthalmic Res. 2011;46(4):199–207. doi: 10.1159/000323910.

17 Stanzel BV, Liu Z, Somboonthanakij S, Wongsawad W, Brinken R, Eter N. Human RPE stem cells grown into polarized RPE monolayers on a polyester matrix are maintained after grafting into rabbit subretinal space. Stem Cell Reports. 2014;2(1):64–77. doi: 10.1016/j.stemcr.2013.11.005.

18 Puissant B, Barreau C, Bourin P, Clavel C, Corre J, Bousquet C, et al. Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. Br J Haematol. 2005;129(1):118–29. doi: 10.1111/j.1365-2141.2005.05409.x.

19 Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. Nat Rev Immunol. 2008;8(9):726–36. doi: 10.1038/nri2395.

20 Chen H, Cho KS, Vu THK, Shen CH, Kaur M, Chen G, et al. Commensal microflora-induced T cell responses mediate progressive neurodegeneration in glaucoma. Nat Commun. 2018;9(1):3209. doi: 10.1038/s41467-018-05681-9.

21 Qin Y, Lam S, Yam GHF, Choy KW, Liu DTL, Chiu TYH, et al. A rabbit model of age-dependant ocular hypertensive response to topical corticosteroids. Acta Ophthalmol. 2012;90(6):559–63. doi: 10.1111/j.1755-3768.2010.02016.x.

22 Khan SU, Ashraf M, Salam A, Ali Z, Rahman MU, Shah A. Steroid induced ocular hypertension: an animal model. Gomal J Med Sci. 2014;12(2):115–7.

23 Pereira FQ, Bercht BS, Soares MG, da Mota MG, Pigatto JA. Comparison of a rebound and an applanation tonometer for measuring intraocular pressure in normal rabbits. Vet Ophthalmol. 2011;14(5):321–6. doi: 10.1111/j.1463-5224.2011.00879.x.

24 Silva-Cote I, Cruz-Barrera M, Cañas-Arboleda M, Correa-Araujo L, Méndez L, Jagielska J, et al. Strategy for the generation of engineered bone constructs based on umbilical cord mesenchymal stromal cells expanded with human platelet lysate. Stem Cells Int. 2019;2019:7198215. doi: 10.1155/2019/7198215.

25 Cañas-Arboleda M, Beltrán K, Medina C, Camacho B, Salguero G. Human platelet lysate supports efficient expansion and stability of Wharton's jelly mesenchymal stromal cells via active uptake and release of soluble regenerative factors. Int J Mol Sci. 2020;21(17):6284. doi: 10.3390/ijms21176284.

Downloaded from http://karger.com/ore/article-pdf/67/1/232/4218130/000538183.pdf by guest on 22 April 2024

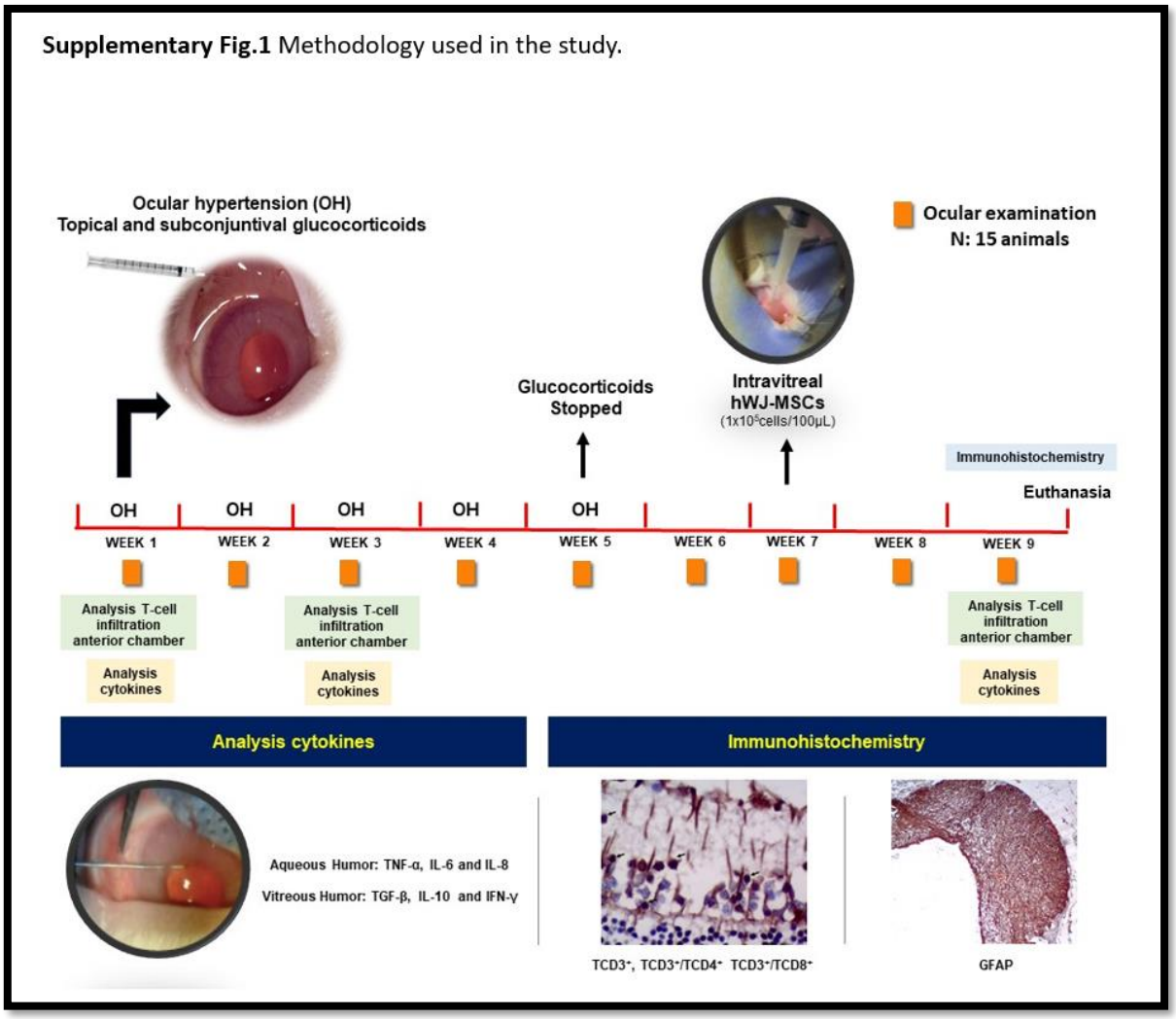
26 Rojas WM, Juan-Manuel Anaya C, Luz Elena Cano R, Aristizábal B, Luis Miguel Gómes O, Lopera D. Inmunología de Rojas. 17th ed. Medellin, Colombia: Corporacion para Investigaciones Biologicas (CIB); 2015. 592.
27 Bull ND, Limb GA, Martin KR. Human Müller stem cell (MIO-M1) transplantation in a rat model of glaucoma: survival, differentiation, and integration. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2008;49(8):3449–56. doi: 10.1167/iovs.08-1770.
28 Leow SN, Luu CD, Hairul Nizam MH, Mok PL, Ruhaslizan R, Wong HS. Safety and efficacy of human wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells therapy for retinal degeneration. PLoS One. 2015;10(6):e0128973. doi: 10.1371/journal.pone.0128973.
29 Overby DR, Bertrand J, Tektas OY, Boussommier-Calleja A, Schicht M, Ethier CR, et al. Ultrastructural changes associated with dexamethasone-induced ocular hypertension in mice. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2014;55(8):4922–33. doi: 10.1167/iovs.14-14429.
30 Jain A, Wordinger RJ, Yorio T, Clark AF. Role of the alternatively spliced glucocorticoid receptor isoform GRβ in steroid responsiveness and glaucoma. J Ocul Pharmacol Ther. 2014;30(2–3):121–7. doi: 10.1089/jop.2013.0239.
31 Quigley HA, Addicks EM. Regional differences in the structure of the lamina cribrosa and their relation to glaucomatous optic nerve damage. Arch Ophthalmol. 1981;99(1):137–43. doi: 10.1001/archopht.1981.03930010139020.
32 Pena JD, Taylor AW, Ricard CS, Vidal I, Hernandez MR. Transforming growth factor beta isoforms in human optic nerve heads. Br J Ophthalmol. 1999;83(2):209–18. doi: 10.1136/bjo.83.2.209.
33 Kokubun T, Tsuda S, Kunikata H, Yasuda M, Himori N, Kunimatsu-Sanuki S, et al. Characteristic profiles of inflammatory cytokines in the aqueous humor of glaucomatous eyes. Ocul Immunol Inflamm. 2018;26(8):1177–88. doi: 10.1080/09273948.2017.1327605.
34 Crawford Downs J, Roberts MD, Sigal IA. Glaucomatous cupping of the lamina cribrosa: a review of the evidence for active progressive remodeling as a mechanism. Exp Eye Res. 2011;93(2):133–40. doi: 10.1016/j.exer.2010.08.004.
35 Quigley HA, McKinnon SJ, Zack DJ, Pease ME, Kerrigan-Baumrind LA, Kerrigan DF, et al. Retrograde axonal transport of BDNF in retinal ganglion cells is blocked by acute IOP elevation in rats. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2000;41(11):3460–6.
36 Tezel G, Wax MB. Glial modulation of retinal ganglion cell death in glaucoma. J Glaucoma. 2003;12(1):63–8. doi: 10.1097/00061198-200302000-00014.
37 Vorwerk CK, Naskar R, Schuettauf F, Quinto K, Zurakowski D, Gochenauer G. Depression of retinal glutamate transporter function leads to elevated intravitreal glutamate levels and ganglion cell death. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2000;41(11):3615–21.
38 González-Scarano F, Baltuch G. Microglia as mediators of inflammatory and degenerative diseases. Annu Rev Neurosci. 1999;22:219–40. doi: 10.1146/annurev.neuro.22.1.219.
39 Weiner HL. A shift from adaptive to innate immunity: a potential mechanism of disease progression in multiple sclerosis. J Neurol. 2008;255(Suppl 1):3–11. doi: 10.1007/s00415-008-1002-8.
40 Serra HA, Roganovich JM, Rizzo LFL. Glucocorticoides: paradigma de medicina traslacional. De lo molecular al uso clínico. Med B Aires. 2012;72(2):158–70.
41 DeMaio A, Mehrotra S, Sambamurti K, Husain S. The role of the adaptive immune system and T cell dysfunction in neurodegenerative diseases. J Neuroinflammation. 2022;19(1):251–19. doi: 10.1186/s12974-022-02605-9.
42 Tezel G, Wax MB. The immune system and glaucoma. Curr Opin Ophthalmol. 2004;15(2):80–4. doi: 10.1097/00055735-200404000-00003.
43 Liton PB, Luna C, Bodman M, Hong A, Epstein DL, Gonzalez P. Induction of IL-6 expression by mechanical stress in the trabecular meshwork. Biochem Biophys Res Commun. 2005;337(4):1229–36. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.09.182.
44 Streilein JW. Ocular immune privilege: the eye takes a dim but practical view of immunity and inflammation. J Leukoc Biol. 2003;74(2):179–85. doi: 10.1189/jlb.1102574.
45 Genini S, Beltran WA, Stein VM, Aguirre GD. Isolation and ex vivo characterization of the immunophenotype and function of microglia/macrophage populations in normal dog retina. Adv Exp Med Biol. 2014;801:339–45. doi: 10.1007/978-1-4614-3209-8_43.
46 Gramlich OW, Godwin CR, Heuss ND, Gregerson DS, Kuehn MH. T and B Lymphocyte deficiency in Rag1−/− mice reduces retinal ganglion cell loss in experimental glaucoma. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2020;61(14):18. doi: 10.1167/iovs.61.14.18.
47 Huang P, Zhang SSM, Zhang C. The two sides of cytokine signaling and glaucomatous optic neuropathy. J Ocul Biol Dis Infor. 2009;2(2):78–83. doi: 10.1007/s12177-009-9026-6.
48 Khalef N, Labib H, Helmy H, El Hamid MA, Moemen L, Fahmy I. Levels of cytokines in the aqueous humor of eyes with primary open angle glaucoma, pseudoexfoliation glaucoma and cataract. Electron Physician. 2017;9(2):3833–7. doi: 10.19082/3833.
49 Pantalon A, Obadă O, Constantinescu D, Feraru C, Chiseliță D. Inflammatory model in patients with primary open angle glaucoma and diabetes. Int J Ophthalmol. 2019;12(5):795–801. doi: 10.18240/ijo.2019.05.15.
50 Yang Y, Abdulatef ASWA, Zhang L, Jiang H, Zeng Z, Li H, et al. Cross-talk between MYOC p. Y437H mutation and TGF-β2 in the pathology of glaucoma. Int J Med Sci. 2020;17(8):1062–70. doi: 10.7150/ijms.43614.
51 Dheen ST, Kaur C, Ling EA. Microglial activation and its implications in the brain diseases. Curr Med Chem. 2007;14(11):1189–97. doi: 10.2174/092986707780597961.
52 Prasanna JS, Gopalakrishnan D, Shankar SR, Vasandan AB. Pro-inflammatory cytokines, IFNc and TNFa, influence immune properties of human bone marrow and wharton jelly mesenchymal stem cells differentially. PLos One. 2010 [cited 2019 Jul 10];5. Available from: http://www.plosone.org/article/info:doi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0009016.
53 Sabapathy V, Sundaram B, VM S, Mankuzhy P, Kumar S. Human Wharton's jelly mesenchymal stem cells plasticity augments scar-free skin wound healing with hair growth. PLoS One. 2014;9(4):e93726. doi: 10.1371/journal.pone.0093726.
54 English K, Barry FP, Field-Corbett CP, Mahon BP. IFN-gamma and TNF-alpha differentially regulate immunomodulation by murine mesenchymal stem cells. Immunol Lett. 2007;110(2):91–100. doi: 10.1016/j.imlet.2007.04.001.
55 Djouad F, Charbonnier LM, Bouffi C, Louis-Plence P, Bony C, Apparailly F, et al. Mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of dendritic cells through an interleukin-6-dependent mechanism. Stem Cell. 2007;25(8):2025–32. doi: 10.1634/stemcells.2006-0548.
56 Yang X, Zeng Q, Göktaş E, Gopal K, Al-Aswad L, Blumberg DM, et al. T-lymphocyte subset distribution and activity in patients with glaucoma. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2019;60(4):877–88. doi: 10.1167/iovs.18-26129.
57 Lai RC, Arslan F, Lee MM, Sze NSK, Choo A, Chen TS, et al. Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. Stem Cell Res. 2010;4(3):214–22. doi: 10.1016/j.scr.2009.12.003.
58 Tuekprakhon A, Sangkitporn S, Trinavarat A, Pawestri AR, Vamvanij V, Ruangchainikom M, et al. Intravitreal autologous mesenchymal stem cell transplantation: a non-randomized phase I clinical trial in patients with retinitis pigmentosa. Stem Cell Res Ther. 2021;12(1):52. doi: 10.1186/s13287-020-02122-7.
59 Mrahleh MA, Matar S, Jafar H, Wehaibi S, Aslam N, Awidi A. Human Wharton's jelly-derived mesenchymal stromal cells primed by tumor necrosis factor-α and interferon-γ modulate the innate and adaptive immune cells of type 1 diabetic patients. Front Immunol. 2021;12:732549. doi: 10.3389/fimmu.2021.732549.
60 Ulhaq ZS, Soraya GV, Hasan YTN, Rachma LN, Rachmawati E, Shodry S, et al. Serum IL-6/IL-10 ratio as a biomarker for the diagnosis and severity assessment of primary-open angle glaucoma. Eur J Ophthalmol. 2022;32(4):2259–64. doi: 10.1177/11206721211037133.

Downloaded from http://karger.com/ore/article-pdf/67/1/232/4218313/000538183.pdf by guest on 22 April 2024

61 Meisel R, Zibert A, Laryea MD, Göbel U, Däubener W, Dilloo D. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. Blood. 2004;103(12):4619–21. doi: 10.1182/blood-2003-11-3909.
62 Šedý J, Bekiaris V, Ware CF. Tumor necrosis factor superfamily in innate immunity and inflammation. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2014;7(4):a016279. doi: 10.1101/cshperspect.a016279.
63 Fuchs C, Forster V, Balse E, Sahel JA, Picaud S, Tessier LH. Retinal-cell-conditioned medium prevents TNF-alpha-induced apoptosis of purified ganglion cells. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2005;46(8):2983–91. doi: 10.1167/iovs.04-1177.
64 Baltmr A, Duggan J, Nizari S, Salt TE, Cordeiro MF. Neuroprotection in glaucoma: is there a future role? Exp Eye Res. 2010;91(5):554–66. doi: 10.1016/j.exer.2010.08.009.
65 Rieck J. The pathogenesis of glaucoma in the interplay with the immune system. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2013;54(3):2393–409. doi: 10.1167/iovs.12-9781.
66 Doucette LP, Rasnitsyn A, Seifi M, Walter MA. The interactions of genes, age, and environment in glaucoma pathogenesis. Surv Ophthalmol. 2015;60(4):310–26. doi: 10.1016/j.survophthal.2015.01.004.
67 Zhang D, Hu X, Qian LI, Wilson B, Lee C, Flood P, et al. Prostaglandin E2 released from activated microglia enhances astrocyte proliferation in vitro. Toxicol Appl Pharmacol. 2009;238(1):64–70. 10.1016/j.taap.2009.04.015.
68 Agarwal R, Agarwal P. Glaucomatous neurodegeneration: an eye on tumor necrosis factor-alpha. Indian J Ophthalmol. 2012;60(4):255–61. doi: 10.4103/0301-4738.98700.
69 Wang AYL, Loh CYY, Shen HH, Hsieh SY, Wang IK, Lee CM, et al. Human Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cell-Mediated Sciatic Nerve Recovery Is Associated with the Upregulation of Regulatory T Cells. Int J Mol Sci. 2020 Aug 31;21(17):6310. doi: 10.3390/ijms21176310.
70 Shao M, Xu Q, Wu Z, Chen Y, Shu Y, Cao X, et al. Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells ameliorate IL-6-induced acute liver injury through miR-455-3p. Stem Cell Res Ther. 2020 Jan 23;11(1):37. doi: 10.1186/s13287-020-1550-0.

Downloaded from http://karger.com/ore/article-pdf/67/1/232/4218313/000538183.pdf by guest on 22 April 2024

Supplementary Fig.1 Methodology used in the study.



CONCLUSIONES

- <u>Infiltración celular</u>
  - El aumento de la PIO se asoció con la activación del sistema inmunológico y la infiltración de células T en el ojo, lo que sugiere una respuesta inmune a la HO. La inyección intravítrea, aunque menos invasiva que otros métodos de administración, puede desencadenar una respuesta inmunitaria localizada debido a la introducción de agentes terapéuticos o células en el espacio intravítreo, lo que explica la infiltración observada en menor medida. Así, tanto el aumento de la PIO como la inyección intravítrea pueden provocar una respuesta inmunitaria en el ojo, aunque con diferentes niveles de intensidad y mecanismos de acción.
  - La menor infiltración de linfocitos $TCD3^+$ en el grupo de HO tratado con WJ-MSCs sugiere que la terapia intravítrea podría reducir la infiltración celular, respaldando la idea de que el

tratamiento con células madre podría modular la respuesta inmunitaria en el glaucoma. Sin embargo, el aumento significativo de la infiltración celular observado solo en el grupo de HO sin tratamiento sugiere que la PIO elevada es un factor determinante en la exacerbación de la infiltración celular con el tiempo. Estos resultados subrayan la importancia de controlar la PIO en el manejo del glaucoma y abordan la necesidad de tratar tanto la PIO como la respuesta inmunitaria en esta enfermedad.

- Citoquinas
  - Los resultados sugieren que tanto el aumento de la PIO como los cambios en la MT inducidos por los glucocorticoides están vinculados a modificaciones en los niveles de TNF-α, IL-6 y TGF-β en el humor acuoso. Estos hallazgos respaldan la hipótesis de que la PIO elevada y los efectos de los glucocorticoides pueden desencadenar respuestas inflamatorias en el ojo, contribuyendo a la patogénesis del glaucoma.
  - La observación de un aumento en los niveles de IFN-γ en el grupo tratado con trasplante de WJ-MSCs sugiere un efecto potencial de la terapia celular en la modulación de la respuesta inmune en el ojo. Este hallazgo podría indicar una activación selectiva de ciertas vías inmunitarias específicas en el grupo tratado. Sin embargo, la reducción significativa de esta citocina al compararse con el grupo de HO sin terapia sugiere una posible supresión de la respuesta inflamatoria, lo que respalda la idea de que las WJ-MSCs pueden ejercer un efecto inmunomodulador en el ambiente intraocular. Este resultado es relevante para comprender mejor los mecanismos mediante los cuales las células madre podrían ofrecer neuroprotección en el glaucoma y justifica una mayor investigación sobre el papel de la respuesta inmune en la patogénesis y el tratamiento de esta enfermedad ocular.
  - Los resultados revelaron una tendencia hacia niveles más elevados de TGF-β en los grupos con HO tratados con trasplante de WJ-MSCs en comparación con los grupos que no recibieron esta terapia. Estos hallazgos sugieren un posible impacto directo en la regulación de esta citocina en el ambiente intraocular y respaldan la idea de un efecto modulador de la terapia en los niveles de TGF-β.
  - El incremento en los niveles de TNF-α, observado tanto en los grupos con HO como en aquellos sin HO que recibieron terapia intravítrea, sugiere una posible respuesta inflamatoria asociada no solo al aumento de la PIO, sino también a factores relacionados con la terapia intravítrea. Por otro lado, el grupo que recibió terapia celular junto con HO mostró una reducción en los niveles de TNF-α, lo que sugiere un efecto modulador del

trasplante de WJ-MSCs en la regulación de esta citocina. Estos hallazgos indican que la terapia celular podría desempeñar un papel crucial en la regulación de la respuesta inflamatoria asociada al glaucoma, con importantes implicaciones para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para esta enfermedad.

- El aumento de IL-8 observado en todos los grupos sugiere una relación no solo con el incremento de la PIO debido a la activación de células inmunitarias en respuesta al daño ocular, sino también con el estrés celular en el ojo inducido por la inyección de sustancias en el cuerpo vítreo. Este estrés celular, provocado por la introducción de materiales extraños durante la inyección intravítrea, puede contribuir a la producción y liberación de IL-8 como parte de la respuesta inflamatoria ocular.
- Los resultados muestran una variación significativa en los niveles de IL-6 entre los diferentes grupos de estudio. En primer lugar, se observó un aumento no significativo en el grupo de terapia celular, lo que sugiere que la aplicación de la terapia podría tener un efecto moderado en la regulación de los niveles de esta citocina. Por otro lado, el grupo de hipertensión que recibió terapia mostró una disminución considerable en los niveles de IL-6 en comparación con el grupo control, lo que sugiere un posible efecto modulador de la terapia en la respuesta inflamatoria asociada con la HO. Además, el hecho de que el grupo con HO presentara niveles significativamente más altos de IL-6 en comparación con los otros grupos sugiere que la HO puede estar asociada con un aumento en la inflamación intraocular. Estos hallazgos respaldan la importancia de controlar la inflamación en el contexto del glaucoma y sugieren un posible papel terapéutico de la terapia celular en la modulación de la respuesta inflamatoria en esta enfermedad.

➢ <u>Inmunohistoquímica</u>

- La observación de una infiltración de células $TCD3^+$ en la CCGRs, más notable en el grupo que no recibió terapia celular, junto con su presencia en la CNI, sugiere una activación inmunitaria en estas áreas. Este hallazgo apoya la hipótesis de que el aumento de la PIO y la ausencia de terapia celular pueden desencadenar una respuesta inflamatoria en la retina, especialmente en regiones asociadas con la degeneración ganglionar y la función neuronal.
- La presencia selectiva de linfocitos $TCD3^+/TCD4^+$ en la CCGRs en el grupo de HO que recibió terapia celular sugiere una posible modulación de la respuesta inmunitaria inducida por la terapia. Es probable que estos linfocitos desempeñen un papel en la regulación de la respuesta inmune local en la retina en respuesta a la terapia celular. Este hallazgo podría

indicar un efecto específico de las WJ-MSCs en la modulación del perfil de linfocitos T en el microambiente ocular, lo que incluiría la inducción de células reguladoras y la activación de otras células del sistema inmune.

- La presencia de linfocitos $TCD3^+/TCD4^+$ en la CNI de la retina en todos los grupos del estudio podría indicar una respuesta inmune local que involucra la activación de varias células neuronales en un intento de mantener la homeostasis ocular. La activación celular podría estar relacionada con la necesidad de contrarrestar el daño causado por la inflamación o el estrés celular inducido por condiciones como HO. Las neuronas de la retina pueden responder a la presencia de linfocitos $TCD3^+/TCD4^+$ mediante la liberación de factores neuroprotectores o la activación de mecanismos de reparación celular para mantener la función visual y la integridad retiniana. Sin embargo, es importante tener en cuenta que la presencia de linfocitos $TCD3^+/TCD4^+$ en la CNI también puede indicar una respuesta inmune desregulada o patológica que contribuye al daño neuronal en lugar de protegerlo.
- Es posible que la terapia con WJ-MSCs haya suprimido la respuesta inmune en el nervio óptico, lo que resulta en una reducción o prevención de la infiltración de linfocitos $TCD3^+/TCD4^+$en esta región.
- La detección de infiltración de linfocitos $TCD3^+/TCD8^+$ en la CCGRs, la CNI y el nervio óptico en todos los grupos estudiados sugiere la presencia de cambios en el microambiente retiniano. Estos cambios podrían estar relacionados con la liberación de citoquinas proinflamatorias y la activación de células gliales, que a su vez pueden reclutar y activar linfocitos $TCD3^+/TCD8^+$ en la retina como parte de la respuesta inmune local.
- La detección de GFAP en varias capas de la retina, incluyendo la CCGRs, la capa plexiforme interna, la CNI y la capa nuclear externa, indica una respuesta generalizada de las células gliales en diferentes regiones de la retina. Esta respuesta sugiere que las células trasplantadas pueden influir en la activación de las células gliales en la retina, posiblemente como parte de un proceso de reparación o protección del tejido retiniano. Sin embargo, la gliosis observada en el grupo de HO sugiere una activación de las células gliales, especialmente los astrocitos, en respuesta al daño o estrés celular en el tejido retiniano. Esto puede ser causado por el aumento de la PIO y otros factores asociados con la HO, que desencadenan una respuesta reactiva de las células gliales para proteger o reparar el tejido dañado. La gliosis puede ser una respuesta adaptativa para mantener la homeostasis y la

integridad del tejido retiniano en condiciones de estrés o daño, pero también puede contribuir a la progresión de la enfermedad si se vuelve crónica o excesiva.

6. DISCUSIÓN

En este estudio se investigó el potencial neuroprotector de las MSCs derivadas de WJ-MSCs en la retina y el nervio óptico utilizando un modelo animal in vivo con características tempranas de HO. Este modelo fue diseñado para reflejar los cambios morfológicos y funcionales asociados con el glaucoma. A partir de este modelo de HO, se utilizaron técnicas diagnósticas para evaluar los efectos de la terapia celular en el perfil de ciertas citoquinas en el humor acuoso y vítreo, así como su relación con la respuesta inmunitaria intraocular en ojos tratados con la inyección intravítrea de WJ-MSCs.

En el **Capítulo 1** de esta investigación, se describieron los modelos experimentales utilizados para inducir HO en conejos con el objetivo de replicar las condiciones del glaucoma. Se basaron en dos modelos previamente descritos en la literatura que emplearon glucocorticoides (74,295,327): uno realizado por Qin et al. (2012), que demostró que la aplicación tópica de corticoides cuatro veces al día durante 30 días elevaba la PIO en 5 mmHg (74), y otro realizado por Melena et al. (1998), que usó aplicaciones subconjuntivales de betametasona de manera semanal para mantener una PIO elevada (295). No obstante, estos modelos presentaban limitaciones, como la necesidad de múltiples aplicaciones diarias del fármaco inductor de HO, variaciones individuales en la respuesta al tratamiento y cambios continuos en la PIO, incluso después de suspender el medicamento (72,74,368). Por tanto, se desarrolló un modelo experimental que superara estas limitaciones y reprodujera de manera más precisa los cambios característicos del glaucoma.

El modelo combinado utilizó la aplicación tópica y subconjuntival de glucocorticoides, administradas dos veces al día y una vez por semana, respectivamente. Esta estrategia permitió inducir un aumento progresivo y constante de la PIO en los ojos experimentales, lo que se correlacionó con el inicio del daño estructural glaucomatoso tanto en la malla trabecular como en el nervio óptico. Esta caracterización clínica del modelo facilitó el diagnóstico temprano de la HO y permitió proceder con el trasplante celular para evaluar su efectividad en el tratamiento del glaucoma. El modelo de HO ideal para esta investigación requería, como prerrequisito para la aplicación de la terapia celular, la inducción de cambios morfológicos constantes tras la discontinuidad del fármaco, para no interferir en el trasplante celular. El modelo experimental propuesto exhibió similitudes clínicas y morfológicas con el GPAA (316). Esta similitud fue crucial, ya que el GPAA es la forma más común de glaucoma en humanos y representa un objetivo

terapéutico importante. Además, el modelo de HO fue económico y permitió inducir una HO temprana, consistente y duradera, incluso después de suspender el tratamiento farmacológico. Cabe destacar que este modelo experimental no generó molestias oculares significativas en los animales, lo que facilitó su utilización para otras investigaciones en el área del glaucoma.

La HO inducida por glucocorticoides suele ser reversible tras la interrupción del fármaco, pero la pérdida de visión y el daño estructural y funcional de la retina y el nervio óptico son irreversibles (317,369). En este estudio, se observó que los animales que no recibieron WJ-MSCs mantuvieron la PIO elevada hasta el final del estudio, incluso tras la suspensión del fármaco en la semana 5. En contraste, el grupo HO que recibió terapia celular mostró una reducción de la PIO a valores normales. Este hallazgo sugiere que las MSCs podrían activarse incluso en un entorno inmunosupresor, como la HO inducida por glucocorticoides. Aunque el mecanismo exacto de acción de las MSCs aún no está claro, se postula que, debido a la similitud entre el glaucoma inducido por glucocorticoides y el GPAA, el microambiente ocular podría estar sujeto a un proceso inflamatorio similar al descrito en el GPAA (172) y al encontrado en este estudio al medir ciertas citoquinas en la etapa inicial. En este contexto, las MSCs podrían activarse para disminuir la inflamación local y ejercer así su actividad inmunomoduladora y neuroprotectora (291). Aunque los resultados positivos obtenidos con la aplicación de MSCs derivadas del tejido de cordón umbilical sobre la PIO son alentadores, sería interesante corroborar estos resultados a largo plazo y en un mayor número de individuos para validar su eficacia y seguridad en el tratamiento del glaucoma.

Variaciones circadianas de la PIO son observables en animales, tal como se ha descrito en humanos. Por lo tanto, las mediciones de la PIO en los animales del estudio se realizaron siempre a la misma hora del día. Es conocido que los animales utilizados en investigaciones muestran un ligero aumento de la PIO durante la fase de oscuridad en comparación con la fase luminosa. Este fenómeno se atribuye a un aumento en la producción de humor acuoso y a la limitada capacidad de evacuación del mismo debido a la anatomía ocular de estos animales (370,371). Este patrón fue corroborado por Jia *et al.* (2000) (372), quienes observaron que en algunos casos los aumentos en la PIO en animales experimentales solo se demostraban durante la fase nocturna. En este estudio, se observó una leve elevación de la PIO en el período de la tarde en comparación con la mañana, lo que indica una adecuada aclimatación de los animales al entorno experimental.

En relación con la evaluación oftalmológica mediante biomicroscopía con lámpara de hendidura, se observó la presencia de efectos inflamatorios en el segmento anterior del ojo de un animal que recibió terapia celular. Sin embargo, es importante destacar que esta observación podría

atribuirse a la técnica de recolección de la muestra de humor acuoso, y no necesariamente a un efecto inflamatorio inducido por las WJ-MSCs en el segmento anterior. No obstante, se considera fundamental realizar estudios a largo plazo para garantizar la seguridad y eficacia del uso de estas células en el tratamiento del glaucoma.Por otro lado, el aumento de la PIO en el segmento posterior del ojo ocasiona la compresión de los pequeños vasos sanguíneos y las fibras del nervio óptico, lo que resulta en una pérdida progresiva de la visión debido a alteraciones de las CGRs (175) y cambios visibles como la excavación del nervio óptico, la palidez de papila, la atrofia peripapilar y ángulos repentinos en el trayecto de los vasos sanguíneos (373). Durante las últimas semanas del estudio, se observaron cambios morfológicos en el segmento posterior en el grupo de HO sin terapia celular, tales como dilatación y tortuosidad de los vasos, excavación del nervio óptico y cambios en la cabeza del nervio óptico. Sin embargo, estos hallazgos no se observaron en el grupo de HO que recibió trasplante intravítreo de WJ-MSCs. Es importante destacar que no se puede concluir que las células hayan evitado estas alteraciones en el grupo de HO tratado con terapia celular, debido a la posible influencia del mayor aumento de la PIO en este grupo, relacionado con la respuesta individual de cada animal, lo que podría explicar las alteraciones observadas en el segmento posterior.

En este estudio, se optó por la administración intravítrea de WJ-MSCs, ya que requiere un menor volumen de células aplicadas en comparación con la vía de aplicación sistémica inyectable (374). Las MSCs tienen la capacidad de secretar factores de crecimiento, citoquinas y exosomas, que pueden tener efectos regenerativos y restauradores en el microambiente ocular (375,376). No obstante, durante la evaluación del segmento posterior en el grupo sin HO que recibió el trasplante celular, se observó una hemorragia intravítrea post-procedimiento en uno de los individuos estudiados, sin que se presentaran alteraciones en los demás animales. Esta complicación podría atribuirse al trauma durante la técnica y no a las características de diferenciación celular de las WJ-MSCs, similares a miofibroblastos, lo que podría contribuir a la fibrosis y tracciones vitreorretinianas, como han descrito algunos autores (377,378). Por lo tanto, esta observación sugiere que la aplicación intravítrea no es completamente inocua y plantea la necesidad de evaluar otras vías de administración, como el trasplante en el espacio subretiniano, para evitar este efecto.

Aunque la terapia celular en la retina parece prometedora, existen varios problemas fundamentales que deben resolverse antes de su aplicación clínica. Uno de estos desafíos es la barrera inhibidora presente en la retina, que impide la migración de las células injertadas desde el sitio del trasplante, independientemente de la vía utilizada (379). Tras la aplicación intravítrea, se observó que la solución de WJ-MSCs migró hasta el nervio óptico, como lo han informado otros

autores (380,381). Es necesario determinar qué porcentaje de las células trasplantadas intraocularmente migraron hacia la retina. Por lo tanto, se sugiere la utilización de marcadores específicos de células madre para evaluar la migración celular.

En cuanto a la realización del modelo experimental de HO, se decidió utilizar el trasplante celular entre especies distintas. La elección de los animales en este estudio se basó en el hecho de que el ojo es un órgano inmunoprivilegiado. Inicialmente, se consideró que existía una baja probabilidad de que el tejido receptor produjera un rechazo inmune de las células trasplantadas. Los resultados ratificaron esta suposición y coincidieron con lo relatado en estudios que utilizan xenotrasplante para el tratamiento de diferentes enfermedades con excelentes resultados, principalmente en la ausencia de rechazo de las células injertadas (382,383). Experimentos similares con xenotrasplantes en enfermedades oftalmológicas también están descritos en la literatura sin la presencia de rechazos (310,384,385).

Además, Bull *et al*. (2008) (386) señalan que la terapia inmunosupresora triple mejora en gran medida la supervivencia de las células trasplantadas. En este sentido, no se observaron signos clínicos de rechazo tras el trasplante intravítreo de WJ-MSCs. Esto sugiere que, además de considerar el ojo como un sitio inmunoprivilegiado (101), las células aplicadas en el vítreo fueron capaces de permanecer vivas tras el trasplante al promover un efecto adicional inmunosupresor, evitando el rechazo en el modelo experimental de glaucoma durante las pocas semanas del estudio. Aunque cabe preguntarse si se observarían efectos post-trasplante intravítreo en solo dos semanas del estudio, los hallazgos coinciden con estudios previos que observaron cambios en la retina de conejos después de cuatro días de la aplicación de MSCs humanas en el vítreo (280), y otros que describen la capacidad de las células de sobrevivir in vivo intraocularmente y responder a su entorno en un periodo de 2 a 3 semanas (386). Sin embargo, la observación a largo plazo podría aportar más información sobre el comportamiento de estas células en un entorno inmunosuprimido.

En el **Capítulo 2** de este estudio, se exploraron los efectos de la terapia celular en la respuesta pupilar y en los potenciales evocados visuales (flash-PEV) en el modelo propuesto de glaucoma. Es relevante señalar que los pacientes con glaucoma pueden experimentar disfunción autonómica relacionada con la progresión de la enfermedad, manifestada por pupilas de mayor diámetro en la oscuridad y respuestas de constricción a la luz anormales (387). Coincidiendo con varios autores, se considera que la respuesta pupilar a la luz es un biomarcador temprano de los cambios funcionales en las CGRs (388). La pupilometría empleada en este estudio permitió cuantificar con precisión los cambios en el tamaño pupilar, lo cual es crucial tanto en la práctica clínica como en la investigación,

superando las pruebas cualitativas de respuesta pupilar a la luz que se basan en observaciones generales. Aunque la pupilometría ofrece objetividad en la medición cuantitativa de los cambios en el tamaño pupilar, es importante considerar que varios factores pueden influir en estas mediciones, como la iluminación de la retina, el estado de acomodación del ojo, la edad y las condiciones emocionales (389,390). Por lo tanto, se prestó especial atención al protocolo utilizado para minimizar la variabilidad y reducir los sesgos en los resultados observados. Este enfoque meticuloso permitió obtener mediciones más confiables y precisas, fundamentales para comprender mejor las alteraciones en la respuesta pupilar asociadas con la HO y la terapia celular.

A pesar de tratarse de un modelo de HO inducido en pocas semanas, se lograron observar los efectos de la HO y de las WJ-MSCs sobre el nervio óptico y la retina en los grupos estudiados. En este estudio, estos cambios se detectaron tempranamente mediante la RPF. Resultados similares se han descrito en la literatura en modelos de HO, donde se observan respuestas pupilares reducidas a intensidades de luz roja (391). No obstante, se encontró un hallazgo interesante al evaluar la luz roja, ya que se observó un aumento del diámetro pupilar en todos los grupos de estudio, aunque no fue significativo en el grupo HO que recibió terapia celular. Dado que los conejos solo tienen conos S y M, y carecen de conos L (responsables de la respuesta a la luz roja), este hallazgo podría indicar interacciones con otras longitudes de onda (392–394), en lugar de ser una respuesta directa al trasplante celular.

Como se ha descrito en la literatura, se observaron deficiencias en las respuestas pupilares a la luz azul en los grupos con HO en comparación con los controles sanos (391,395). específicamente, se notó que el grupo con HO que recibió WJ-MSCs tenía una mayor probabilidad de mantener un diámetro pupilar constante en respuesta a la intensidad de la luz azul después de la aplicación de la terapia celular, en comparación con el grupo sin terapia. Esta observación en RPF puede basarse en que las CGRs y otros tipos de células neuronales pueden sobrevivir durante largos períodos, incluso después de la ceguera, y aún responder a estímulos luminosos (396). La reducción de la RPF a la luz azul se ha asociado previamente con una mayor pérdida del campo visual y la excavación del disco óptico en pacientes con HO (366). En línea con estas observaciones, los resultados obtenidos respaldan esta idea, ya que se observó un aumento significativo en el diámetro pupilar al comparar entre las semanas del estudio en el grupo con HO, que también presentaba alteraciones en el segmento posterior del ojo. Estos hallazgos sugieren que es posible detectar el deterioro de las respuestas pupilares independientemente de la cantidad de melanopsina estimulada, lo que podría proporcionar una estimación del grado de daño en las CGRs.

Además, se observó un aumento significativo en la respuesta de contracción pupilar a la luz azul, aunque esta alteración solo se evidenció durante las primeras semanas del estudio en el grupo con HO que recibió WJ-MSCs. Este hallazgo sugiere un posible efecto neuroprotector y axogénico de la terapia celular sobre estas células en la retina. Sin embargo, es importante señalar que se requiere de más investigación para comprender plenamente los mecanismos subyacentes y el alcance de este efecto en el tratamiento de la HO y el glaucoma. La integración de estas observaciones pupilares con otros marcadores clínicos y estructurales podría proporcionar una comprensión más completa de la eficacia y los efectos de la terapia celular en estos trastornos oftalmológicos. Estos hallazgos plantean la posibilidad de que las pruebas de RPF puedan usarse para detectar disfunciones tempranas del nervio óptico. Una ventaja de esta técnica diagnóstica es que puede incorporarse fácilmente a sistemas portátiles para pruebas en pacientes con sospecha de enfermedad, además de ser accesible, fácil de utilizar y económica, como se observó en este estudio.

Un posible indicador del daño funcional de las CGRs en el glaucoma antes de la muerte celular es el aumento de la latencia en su respuesta en las pruebas de (397). La medición de la latencia puede indicar cuándo las CGRs están en riesgo, permitiendo implementar un tratamiento antes de que se produzcan daños celulares irreversibles. Al utilizar la vía intravítrea, que se encuentra directamente adyacente a la capa de CGRs, se presume una mayor protección de estas células al utilizar WJ-MSCs, ya que estas células son capaces de secretar factores neurotróficos que mejoran la integridad funcional de las conexiones de las CGRs, como ha sido descrito por Mead et al. (398). Sin embargo, en este estudio, los resultados de los flash-VEP no mostraron una mejoría funcional en la latencia de los animales que recibieron trasplante celular, lo cual coincide con los hallazgos de Vilela et al. (377). Este hallazgo podría sugerir que la aplicación intravítrea de células estromales no es un procedimiento completamente inocuo o que el incremento de la sobreexpresión de GFAP, observado en este estudio, es capaz de impedir la regeneración axonal, causando una disfunción metabólica y una alteración electrofisiológica de las neuronas (159,160). No obstante, se observó un aumento de la amplitud (activación axonal) en el grupo con HO tratado con células madre, lo que sugiere que las células podrían ejercer efectos beneficiosos sobre las CGRs, como se describe en los hallazgos de RPF y OCT.

Durante todo el experimento, no se observaron diferencias significativas en las medidas de latencia y amplitud de onda al comparar los grupos en flash-VEP. Es posible que un estudio con un mayor número de ojos pudiera arrojar resultados estadísticamente significativos. Sin embargo, no

se puede afirmar con certeza el efecto que estas células producen sobre la respuesta eléctrica de la retina. Esto se debe a que estudios previos informaron que las células inyectadas por vía intravítrea tienden a cubrir la parte posterior del cristalino, bloqueando el paso de la luz al ojo (399), lo cual puede alterar el análisis electrofisiológico. Por lo tanto, se requerirá más investigación para comprender este efecto. Es difícil realizar comparaciones de estos resultados con otros estudios, ya que los datos dependen de muchos factores, como la distancia del estímulo de luz, la temperatura del animal y el protocolo utilizado (400). Hasta donde se tiene conocimiento, no existe en la literatura ningún trabajo de investigación que reporte métodos electrofisiológicos que midan tanto la función del nervio óptico como la respuesta cerebral a los estímulos visuales en conejos utilizando el aparato RetinoGraphics BPM-300 ERG/VEP.

En este capítulo, también se describen los cambios encontrados en la OCT después de la terapia celular. El glaucoma es una neuropatía óptica progresiva e irreversible caracterizada por la atrofia gradual del nervio óptico y el adelgazamiento de la CFNR, que está constituida por los axones de las células ganglionares de la retina. Algunos estudios apoyan la hipótesis de que la lámina cribosa (LC) también se adelgaza con la progresión del glaucoma (401). in embargo, en este estudio no se pudo demostrar una correlación entre el espesor de la LC y la CFNR. Esto podría atribuirse a la dificultad para visualizar esta estructura, así como a la producción de sombras provenientes del anillo neurorretiniano, lo que impide la observación completa de la morfología y posición de la LC, corroborando lo descrito por algunos autores (402,403). Al medir el grosor de la CFNR, se observó en el grupo de HO un aumento en el grosor de esta capa de la retina solo en las primeras semanas del estudio. Este hallazgo coincide con un estudio que informó que los pacientes con glaucoma uveítico presentaban un mayor grosor de CFNR que los pacientes con otros tipos de glaucoma (404), lo que podría sugerir un papel de la inflamación en las semanas iniciales del aumento de la PIO en el modelo experimental. No obstante, no está descrito en la literatura un rol inflamatorio en el glaucoma inducido por glucocorticoides, por lo que se requieren más investigaciones para comprender este efecto.

A medida que se observó el aumento significativo de la PIO en los grupos de HO, también se evidenció una reducción no significativa del grosor de la CFNR. Estos resultados sugieren que las células WJ-MSCs podrían no ejercer efectos significativos sobre el grosor de la CFNR en el grupo de HO tratado con terapia celular. Además, se observó una tendencia hacia la reducción del grosor de esta capa en el grupo que recibió el trasplante celular sin HO, aunque esta tendencia no fue significativa. Este hallazgo contrasta con las expectativas, ya que se esperaba un aumento en esta

capa debido al efecto de liberación de citoquinas y mediadores inflamatorios secretados inicialmente por el tejido (405). En conjunto, estos resultados sugieren que el procedimiento de trasplante celular intravítreo no es completamente inocuo y puede tener efectos inesperados en la morfología de la retina.

Por otro lado, los grupos que recibieron terapia celular mostraron una disminución en el volumen de la copa óptica y un aumento en el área del borde del nervio óptico. Estos hallazgos pueden estar asociados al aumento del flujo sanguíneo inducido por la terapia celular, como se observó en el estudio histopatológico, lo que ocasiona un engrosamiento del tejido prelaminar y un movimiento anterior de la lámina cribosa óptica (LC), afectando algunas estructuras de la CON (406). Otras explicaciones posibles incluyen un desplazamiento de líquido en respuesta a cambios en la PIO o una proliferación glial prelaminar inducida por la terapia celular(407). Aunque el volumen de la copa óptica disminuye y la PIO baja en el grupo de terapia celular con HO, no se observa un aumento significativo correspondiente en el grosor de la CFNR. Esto sugiere que la explicación de este hallazgo no es probablemente una restauración o aumento en el número de axones, sino una relajación de los tejidos que soportan las estructuras papilares.(408).

Al evaluar la CCGR, se observó una tendencia hacia un mayor grosor en esta capa, así como en el área del disco óptico en el grupo HO trasplantado con WJ-MSCs en comparación con el grupo que no recibió estas células. Esta misma tendencia a retrasar la pérdida de CGRs se observó en un trasplante intravítreo de WJ-MSCs inducido por axotomía (310,409). Una de las características in vivo de las WJ-MSCs es la secreción de moléculas antiinflamatorias y factores tróficos, lo que podría explicar los hallazgos observados (410). La neuroprotección brindada por las WJ-MSCs se corrobora con los datos de respuesta pupilar a la luz azul y flash-PEV, donde se observó un tiempo de respuesta reducido y un aumento de la amplitud en el grupo de HO con trasplante celular, lo que podría indicar una protección de los axones de CGRs (409) en dicho grupo. En el glaucoma, la regeneración de los axones degenerados debe ocurrir en la lámina cribosa remodelada, ya que es improbable que la regeneración axonal ocurra en esta estructura si el factor desencadenante persiste (213).

En este sentido, es posible que las WJ-MSCs intravítreas hayan mejorado el entorno alterado, promoviendo la neuroprotección celular. Esto se alinea con la hipótesis de que el efecto promotor de la regeneración de axones tras el trasplante de células madre probablemente se deba a la liberación de citoquinas o factores de crecimiento, más que a su diferenciación en células neuronales o gliales (411). pesar de las diferencias significativas encontradas en las medidas de la PIO entre los grupos de HO, no se observaron alteraciones significativas en varias medidas de la CNO

en la OCT. Esto sugiere que la reducción de la PIO no es el único factor que condiciona la respuesta de la CNO, y que esta variabilidad podría deberse al pequeño tamaño de la muestra, a la técnica empleada o a la presencia de otros factores modificadores coexistentes (412), como el uso de terapia celular.

El **Capítulo 3** de este estudio se centra en los cambios detectados mediante técnicas de histología e inmunohistoquímica después del uso de terapia celular. Uno de los objetivos específicos fue desarrollar un modelo experimental con signos tempranos de HO. Por ello, se realizaron evaluaciones histológicas para complementar las observaciones del OCT. Es bien sabido que la histopatología desempeña un papel crucial en el diagnóstico de enfermedades oculares, especialmente en casos con presentaciones clínicas poco específicas. En algunos casos, pequeñas lesiones detectadas en histopatología pueden pasar desapercibidas en el OCT o causar cambios clínicos mínimos no evidentes (413,414). Al corroborar la efectividad del modelo experimental propuesto, se identificaron cambios estructurales que no fueron evidentes en el OCT ni en el examen oftalmológico de los animales.

n el contexto del glaucoma inducido por GCs, la elevación de la PIO puede asociarse con la acumulación de glicosaminoglicanos y proteínas en la matriz extracelular del tejido conectivo yuxtacanalicular, así como con el engrosamiento de la vaina que rodea las fibras de la MT (73). Estos cambios pueden inhibir la proliferación y migración de las células responsables de la fagocitosis, lo que conduce a la acumulación de detritus en la cámara anterior (68). Además, una anomalía en la MT puede alterar el sistema de drenaje del humor acuoso, provocando un aumento de la PIO (173). Al examinar histológicamente la malla trabecular en el grupo de HO, se observó fibrosis en la región del cuerpo ciliar y estrechamiento del ángulo iridocorneal. Estos cambios morfológicos podrían estar asociados con el proceso inflamatorio inducido en la MT debido al aumento de citoquinas como TNF-α, IL-8 e IL-6, tal como se refleja en este estudio, a pesar de tratarse de un modelo de HO con GCs.

En la enfermedad glaucomatosa, los cambios pueden manifestarse tanto en el segmento anterior como en el posterior del ojo. La evaluación de la retina y el nervio óptico puede revelar cambios estructurales atróficos y degenerativos significativos después de la exposición a una PIO elevada. Además, las CGRs en degeneración muestran alteraciones morfológicas que incluyen núcleos citoplasmáticos líticos o encogidos y citoplasma hipereosinofílico, característicos de los procesos de apoptosis y necrosis (415). Aunque la apoptosis generalmente no desencadena una respuesta inflamatoria (146), la necrosis y la necroptosis pueden liberar contenido celular

inmunogénico y citoquinas inflamatorias, desencadenando así la inflamación (416). Es interesante señalar que, en este estudio histopatológico, se observaron más cambios necroptóticos que apoptóticos en el modelo de HO propuesto. La necroptosis está regulada por las proteínas quinasas (RIPK) que interactúan con el receptor (RIP) desencadenando un proceso de neurodegeneración, caracterizado por la neovascularización (417). La inhibición de la vía de señalización necroptótica ha demostrado ser eficaz en proporcionar efectos antiangiogénicos en el tratamiento de varios trastornos degenerativos de la retina (418).

La formación de neovascularización en la retina en el grupo de animales con/sin HO que recibieron WJ-MSCs es un hallazgo intrigante que puede atribuirse a diversos factores. En primer lugar, la neovascularización podría ser resultado de la necroptosis producida en el modelo de HO, siendo más evidente en el grupo HO sin terapia celular (417). Esto podría indicar un efecto neuroprotector de las WJ-MSCs en el ojo receptor tras el trasplante intravítreo. Además, el factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGF), liberado por las CGRs para promover la neuroprotección autocrina en respuesta a la alteración del ambiente intraocular (419), podría contribuir a este fenómeno. Por último, las propias MSC podrían tener un efecto directo sobre la angiogénesis, aumentando los niveles de VEGF y su receptor VEGFR2, lo que sugiere que la administración de MSCs puede proporcionar un microambiente restaurador y ejercer un efecto neuroprotector paracrino sobre las CGRs (420). Este conjunto de factores puede explicar la observación de neovascularización en el grupo tratado con WJ-MSCs sin HO.

Además, también se evidenció que los animales que recibieron WJ-MSCs presentaron menos alteraciones en la retina, incluida una mayor tendencia a conservar CGRs. Esto coincide con la hipótesis descrita por Usategui-Martín et al. (421), de que las WJ-MSCs pueden modular los mecanismos implicados en la neurodegeneración, como el estrés oxidativo, la inflamación y los procesos antiapoptóticos, lo que les confiere capacidad neuroprotectora y neurogénica. Por otra parte, se observó la formación de vacuolas intracitoplasmáticas en diferentes capas de la retina, característica de enfermedades neurodegenerativas (422), siendo menos evidente en el grupo de HO sin trasplante celular. Esto podría indicar un efecto beneficioso de la terapia celular en la retina en los demás grupos. Conjuntamente, se observó una tendencia a un menor grosor de la CNI en el grupo de HO con terapia celular, lo que puede estar relacionado con la menor presencia de vacuolas en esta capa de la retina, reduciendo así el tamaño y, consecuentemente, las medidas del grosor.

Cambios en las medidas del grosor de la CFNR podrían correlacionarse con los hallazgos de la OCT en este estudio. Sin embargo, es importante tener en cuenta que el tejido puede deformarse

por edema o contracción durante los procesos de fijación, como han descrito algunos autores (423). El estudio de ojos enucleados puede no reflejar de forma precisa la configuración *in vivo*. Varios factores pueden producir diferencias entre las valoraciones en ojos enucleados y la situación *in vivo*, como son la ausencia de contrapresión retrolaminar o los cambios producidos en la esclera *post-morten* (423,424). Por esta razón, decidimos no utilizar este parámetro en el estudio histopatológico.

Otros cambios relacionados con la neurodegeneración glaucomatosa están asociados con las células de la microglía. Estas células gliales desempeñan una función importante en la supervivencia y/o muerte de las CGRs. Se observaron cambios sugestivos de reactivación, como hipertrofia y aumento de la expresión de GFAP, tanto en la glía retiniana como en la cabeza del nervio óptico (425) en todos los grupos del estudio. Además de la hipertrofia celular, se notó una intensa infiltración celular en el nervio óptico en todos los grupos del estudio. La capacidad de las células gliales para responder rápidamente a cualquier tipo de daño y reactivarse (426) podría explicar la observación de la respuesta glial en el grupo tratado con WJ-MSCs sin HO.

Además de gliosis, se observó una intensa expresión de GFAP en varias capas de la retina en todos los grupos del estudio. Sin embargo, se evidenció una mayor tendencia a la expresión de GFAP en los grupos de HO sin trasplante celular, lo cual está directamente correlacionado con los cambios morfológicos observados en este grupo a lo largo del estudio. Curiosamente, también se observó sobreexpresión de GFAP en algunas capas de la retina en el ojo control. Este hallazgo, descrito también por otros autores (427,428), puede deberse a los cambios morfológicos observados en los astrocitos asociados a modificaciones funcionales, ante la presencia de cambios incipientes potencialmente nocivos en estos ojos, jugando un papel neuroprotector en la supervivencia de las CGRs en modelos experimentales de HO.

Por otra parte, una intensa expresión de GFAP fue evidenciada en el grupo de WJ-MSCs sin HO. Esto podría explicarse por la elección de la vía de administración del trasplante, dado que la aplicación intravítrea de WJ-MSCs es capaz de desencadenar una infiltración transitoria pero masiva de células con marcado Iba1+ (una proteína altamente expresada en microglía y macrófagos) desde la coroides hasta la retina, capaz de alterar la estructura retiniana (310). Esto indica que, incluso sin presentar propiedades tóxicas para la retina y el nervio óptico, la vía intravítrea no puede considerarse un procedimiento inocuo, ya que desencadenó la expresión de GFAP en el grupo sin HO con terapia celular.

En el glaucoma, se ha demostrado que la activación de las células microgliales en la CNO está asociada no solo a cambios morfológicos o la sobreexpresión de algunos marcadores como GFAP y Iba1+, sino también a una activación de la inmunidad innata (429). Las células gliales son capaces de modular la respuesta de los linfocitos T debido a la presentación de antígenos por parte de la microglía, que a su vez regula los niveles de citoquinas inflamatorias (430), seguido de la activación de los astrocitos (431). Una falla en la regulación de las vías de respuesta inmune puede cambiar este estado beneficioso hacia un proceso neurodegenerativo y promover una lesión secundaria en las neuronas (432).

El análisis de los resultados obtenidos en el capítulo 3 revela aspectos fundamentales sobre las respuestas inmunitarias e inflamatorias en el modelo de HO. Se reconoce que el ojo es un órgano inmunoprivilegiado debido a sus mecanismos de defensa y estructuras que limitan las respuestas inmunitarias excesivas y los procesos inflamatorios locales (101,116). Aunque el ojo puede activar respuestas inmunes sin inducir inflamación, la regulación inmune intraocular puede tener consecuencias adversas debido a la capacidad del sistema inmune para causar patologías. En este contexto, se ha sugerido que el glaucoma podría ser resultado de la respuesta del sistema inmune cuando se activa para reparar el tejido dañado (169). Sin embargo, aún no está claro si un entorno proinflamatorio local podría desencadenar un proceso autoinmune, dado que el ojo se considera un sitio privilegiado para el sistema inmune, con una homeostasis selectivamente antiinflamatoria e inmunosupresora (121).

Actualmente, se sugiere que la inmunidad innata desempeña un papel clave en el desarrollo del GPAA, ya que su patogénesis puede ser resultado de la fibrosis de la malla trabecular y la muerte de las CGRs (171). Al desarrollar el modelo de HO con el uso de GCs, surgió la incógnita de si se observasen alteraciones inflamatorias y cambios inmunológicos intraoculares en el modelo propuesto. A pesar de los efectos antiinflamatorios e inmunosupresores de los GCs (433), se encontró una intensa infiltración de linfocitos T en el segmento anterior en los grupos de HO, así como un aumento en los niveles de ciertas citoquinas proinflamatorias tanto en el humor acuoso como en el vítreo. Esto sugiere que este modelo experimental puede presentar un papel proinflamatorio paradójico como respuesta al daño estructural secundario, a pesar de la acción inmunosupresora de los GCs. Esta característica podría explicar el probable efecto neuroprotector del trasplante celular en el grupo de HO.

Aunque las respuestas inmunitarias mediadas por linfocitos T pueden ser beneficiosas para limitar la neurodegeneración dentro del sistema nervioso central, la presencia prolongada de

linfocitos podría desencadenar un sistema de respuesta secundaria, caracterizado por el reclutamiento de más linfocitos circulantes (432), tal como se evidenció en esta investigación. A lo largo del estudio, se observó una pequeña cantidad de linfocitos T en el humor acuoso en la etapa inicial, con una tendencia a aumentar en las semanas posteriores en todos los grupos estudiados. Esta observación puede atribuirse a la activación de macrófagos residuales y la inducción de la expresión de IL-6 (de doble acción, proinflamatoria y antiinflamatoria), IL-1β y TNF-α (proinflamatorias) (172,434). No obstante, la sobreexpresión de linfocitos T también podría explicarse por la aplicación intravítrea de WJ-MSCs, ya que esta activa una respuesta inmune intraocular en un intento por mantenerla controlada (120). El efecto de las MSCs de controlar localmente la inflamación se ha atribuido a la expresión de una amplia variedad de quimioquinas y receptores de citoquinas, lo que les permite migrar a los sitios dañados (435). La capacidad de las WJ-MSCs para modular el sistema inmune está caracterizada por la supresión de linfocitos T, inhibiendo tanto al sistema inmune innato como al adquirido, aunque el mecanismo exacto no está completamente esclarecido.

Estudios in vitro han mostrado que las WJ-MSCs presentan efectos inhibitorios sobre los linfocitos TCD3+, lo que sugiere su capacidad para modular la respuesta inmune y potenciar la reparación/regeneración del tejido dañado. Una observación interesante surgió al detectar una tendencia hacia una menor infiltración de linfocitos TCD3+ en los grupos con HO en comparación con el grupo tratado con WJ-MSCs sin HO en las primeras semanas del estudio. Esta tendencia podría atribuirse al efecto inmunosupresor y antiinflamatorio de los GCs (433) en el modelo experimental de HO. Además, se observó un aumento significativo de células $TCD3^+$ en comparación con los ojos del grupo control y con el grupo tratado con WJ-MSCs sin HO, lo que sugiere que estas células no solo producen efectos inhibitorios sobre las células T, sino que también son capaces de tener algún efecto estimulador sobre algunas estirpes linfocitarias. Coincidiendo con lo descrito por Genini et al. (436), también se observó infiltración de células TCD3+ en algunas capas de la retina en los ojos del grupo control.

Actualmente, no está claro qué subconjuntos de linfocitos T actúan como células efectoras o como desencadenantes de la neurodegeneración glaucomatosa (437). Para esto, se examinaron los perfiles de secreción de citoquinas y quimiocinas que pudieran estar alterados en el modelo de HO inducido por los GCs. Se observó que la HO inducida por GCs también puede aumentar la concentración de IL-6, IL-8, TNF-α, IL-10 e IFN-γ tanto en el humor acuoso como en el vítreo, como se describe en otras formas de glaucoma (188,200,438). En nuestro estudio, corroboramos lo

descrito por Yang *et al*. (439), al observar un aumento en los niveles de TGF-β en el grupo HO, sugiriendo que el incremento de esta citoquina podría ser el factor desencadenante del desequilibrio de determinadas citoquinas en el microambiente ocular.

Este aumento en la concentración de determinadas citoquinas en el glaucoma puede estar relacionado con la activación de la microglía, como se observó por la presencia de gliosis y sobreexpresión de GFAP en este estudio. La marcada activación de la microglía produce una liberación de citoquinas proinflamatorias y agentes citotóxicos, como TNF-α, IL-1β e IL-6, como ha sido descrito anteriormente (440). Al aplicar las WJ-MSCs en el grupo de HO, se observó una reducción de los niveles de IL-6, TNF-α e IFN-γ en comparación con el grupo sin terapia celular. En este contexto, los factores solubles secretados por las MSCs podrían haber desempeñado un efecto inmunomodulador, ya que muchos de los factores secretados por las MSCs son capaces de inhibir a linfocitos Th1 (IFN-γ y TNF-α) (258) y promover la expansión de Treg (TGF-β y IL-10) y Th2(234), modulando el microambiente ocular.

La literatura sugiere que las WJ-MSCs pueden expresar un mayor nivel de factores inmunomoduladores, como TGF-β, en comparación con las MSCs adultas derivadas de la médula ósea (234). Otros autores postulan que el efecto supresor de las MSCs se debe particularmente a factores como TGF-β1, IL-10, IL-6, entre otros (275,314,441). Coincidiendo con esta descripción, se observó una menor concentración de TGF-β en el grupo de HO, así como lo descrito por otros autores (442), frente al grupo que recibió trasplante celular, aunque no fue significativa al comparar con el grupo control. Este proceso indica que las células WJ-MSCs fueron capaces de secretar factores que brindan efectos regenerativos y restauradores para el microambiente ocular (375,376).

Contrariamente a lo observado por Mrahleh et al. (309) en un estudio *in vitro* de WJ-MSCs, no se observó un aumento en la concentración de IL-10 en los grupos de terapia celular. in embargo, en el grupo de HO, esta citoquina se encontraba ligeramente aumentada al compararla con el grupo control. Este aumento de IL-10 asociado al incremento de IL-6 está descrito en el GPAA y puede servir como un biomarcador temprano de la progresión de la enfermedad (217,442). La misma tendencia al aumento en los niveles de IFN-γ fue encontrada en el grupo de HO al comparar con los grupos tratados con WJ-MSCs. Este hallazgo puede atribuirse a la secreción de factores solubles involucrados en los mecanismos inmunosupresores de las MSCs, como NO e IDO, los cuales ejercen un efecto inhibitorio sobre la transducción de señales en linfocitos Th1 e intervienen en la producción de proteínas necesarias para la proliferación de linfocitos (443).

Una de las principales citoquinas alteradas en los procesos glaucomatosos es el TNF-α. Esta citoquina desempeña un papel destacado en el glaucoma debido a su producción temprana y su capacidad para interactuar con la mayoría de las células, ya que todas ellas expresan receptores para TNF-α (197). Es importante destacar que el TNF-α se encuentra habitualmente en ojos sanos, (199), lo que explicaría su presencia en el grupo control del estudio. En condiciones normales, diversas células como las del epitelio pigmentario del iris, el cuerpo ciliar, las células de microglía, y los astrocitos retinianos expresan receptores tipo I y II que permiten mantener la cantidad de esta citoquina dentro de valores no patológicos (199). En la investigación, se observó que tanto el grupo HO sin WJ-MSCs como el grupo de terapia celular sin HO experimentaron un aumento significativo en la concentración de esta citoquina. Este aumento puede estar relacionado con situaciones estresantes, como reacciones inmunitarias, inflamación, isquemia, hipoxia y estrés oxidativo (444). En contraste, el grupo HO que recibió WJ-MSCs mostró una disminución en el nivel de esta citoquina, lo que coincide con otros informes (309). Estos hallazgos demostraron el potencial efecto inmunomodulador de estas células.

Por otra parte, otras citoquinas implicadas en la patología glaucomatosa son la IL-8 y la IL-6. En este estudio, se observó un aumento no significativo de IL-8 en todos los grupos en comparación con el grupo control. Esta observación podría deberse a las características de la IL-8, ya que es una citoquina proinflamatoria con actividades proangiogénicas, lo que podría indicar neuroinflamación o reflejar el estado de remodelación de la matriz extracelular en la MT en presencia de niveles elevados (200,222). Algunos estudios sugieren que la IL-8 puede estimular la producción de VEGF en las MSCs a través de las vías de transducción de señales PI3K/Akt y MAPK/ERK (445), lo que podría explicar la neovascularización observada en todos los grupos del estudio después de la aplicación intravítrea de WJ-MSCs.

Por otro lado, un factor adicional relacionado con la actividad inmunosupresora de las MSCs es la IL-6. Se ha descrito que las MSCs secretan una concentración basal de IL-6, la cual se ve aumentada en presencia de ciertos estímulos como IFN-γ y TNF-α, tal como se observó en los grupos de HO en este estudio. Sin embargo, es importante destacar que el efecto inmunosupresor de las MSCs sobre los linfocitos Th1 es independiente de la IL-6 secretada por las MSCs (446).

Este hallazgo sugiere que las MSCs pueden ejercer su efecto supresor sobre las respuestas inmunitarias de manera multifactorial, utilizando distintos mecanismos que no dependen exclusivamente de la IL-6. La IL-6 es una citoquina con características duales, proinflamatorias y antiinflamatorias, secretada por las células de la microglía en respuesta a una agresión en el sistema

nervioso central (447). Esto podría explicar el aumento de IL-6 post-aplicación intravítrea de WJ-MSCs en el grupo sin HO. Se observó una disminución significativa de esta citoquina en el grupo HO que recibió terapia celular, pero no se observó el mismo comportamiento en el grupo HO. Esta alteración en el microambiente ocular puede estar relacionada con la propiedad antiinflamatoria de las WJ-MSCs, como consecuencia de una supresión en la producción de IL-6 y una reducción en la activación de los monocitos circulantes, provocando la inhibición de esta citoquina (448).

Actualmente, se ha planteado la hipótesis de que el glaucoma es un trastorno autoinmune, ya que la enfermedad empeora incluso después de que la PIO vuelva a la normalidad (449). La presencia de estas células T en la retina es inusual, ya que el ojo presenta barreras que impiden la entrada de estas células en esta estructura. Sin embargo, en situaciones inflamatorias, las uniones estrechas de la barrera pueden dañarse, desencadenando la infiltración de linfocitos T activados hacia la retina. Los linfocitos T juegan un importante papel como mecanismo de protección de las neuronas, minimizando la lesión del nervio óptico en el glaucoma (432,450). Aunque no hay estudios que demuestren que las respuestas inmunitarias desreguladas en el glaucoma puedan conducir a una lesión neuronal mediada por linfocitos T (442), esta investigación mostró infiltración de células $TCD3^+$ observadas tanto en el segmento anterior como en la retina, incluso en un entorno inmunodeprimido.

Curiosamente, los grupos que recibieron células madre tendieron a presentar una menor infiltración celular en comparación con los grupos HO sin WJ-MSCs, que mostraron entre un 25% y un 50% de inmunotinción. Estas observaciones corroboran los hallazgos tanto in vivo en el segmento anterior como *in vitro* sobre el comportamiento inhibitorio de las WJ-MSCs sobre los linfocitos $TCD3^+$, lo que sugiere un importante efecto modulador de estas células en el modelo experimental propuesto.

Al evaluar la infiltración de células TCD3+/CD4+, se observó una mayor infiltración en la capa nuclear interna en el grupo de HO sin terapia celular. No obstante, al evaluar la CCGRs, se observó un efecto terapéutico en el grupo de HO que recibió el trasplante celular, como lo descrito anteriormente en el OCT y en el estudio histológico, siendo el único grupo con infiltración de células TCD4+ en esta capa de la retina. Se ha demostrado que las MSCs son capaces de generar células $TCD4^+$ reguladoras, $TCD25^+$ y $Foxp3^+$ *in vitro* (451), así como factores supresores como el TGF-β [314], similar a lo observado en este estudio. Esto puede deberse al efecto inmunomodulador de las MSCs sobre las células $TCD4^+$ a través de la activación de células inmunorreguladoras, como las

células dendríticas tolerogénicas, capaces de inhibir las respuestas de células T específicas de antígeno (309), lo que podría contribuir a la neuroprotección en este modelo experimental.

Contrario a lo observado por Yan et al. (442) en muestras de sangre periférica de pacientes con glaucoma, en este estudio se observó un porcentaje significativamente mayor de infiltración de células $TCD8^{+}$ en varias capas de la retina, frente a los ojos controles. Un hallazgo interesante se presentó al evaluar la CCGRs, donde se observó que el único grupo que presentó una intensa infiltración de $TCD8^{+}$ en esta capa de la retina fue el grupo HO. Este hallazgo podría indicar que la inmunidad celular también desempeña un papel esencial en el inicio y/o progresión de la neuropatía óptica glaucomatosa (188). Esta observación plantea preguntas importantes sobre cómo estas células podrían contribuir a la neuroinflamación y la neurodegeneración en el contexto del glaucoma, destacando la necesidad de investigaciones adicionales para abordar estas interrogantes y avanzar en la comprensión de la enfermedad.

- ***LIMITACIONES ENCONTRADAS EN EL ESTUDIO***

El presente estudio presenta algunas limitaciones que deben considerarse al interpretar los resultados. En primer lugar, el tamaño de la muestra fue relativamente pequeño, lo que podría afectar la robustez de los hallazgos. Aunque un tamaño muestral mayor podría haber fortalecido los resultados, los datos obtenidos constituyen un punto de partida significativo para avanzar en la comprensión de los efectos del trasplante celular intravítreo de WJ-MSCs en un modelo experimental de HO inducido por glucocorticoides.

Una limitación importante es la dificultad para atribuir con certeza el efecto de las WJ-MSCs sobre la PIO. Aunque se observó una reducción de la PIO en el grupo tratado con las células, esta disminución podría haberse visto influenciada por la interrupción del tratamiento con medicación hipotensora. Sin embargo, al comparar los grupos de HO, se notó un aumento significativo de la PIO en ambos grupos a partir de la semana 3 del estudio, manteniéndose elevada hasta la semana 9 en el grupo sin terapia celular y con una reducción en la semana 8 (post-trasplante intravítreo de WJ-MSCs) en el grupo con trasplante celular, lo que sugiere un posible efecto protector de las células trasplantadas.

A pesar de las diferencias significativas en la PIO entre los grupos de HO, no se observaron alteraciones significativas en varias medidas de la cabeza del nervio óptico (NO) en la OCT. Esto sugiere que la reducción de la PIO no es el único factor que influye en la respuesta del NO. La variabilidad en la respuesta del NO podría deberse a limitaciones como el pequeño tamaño de las

muestras, la técnica de medición utilizada o la presencia de otros factores modificadores (412), como la terapia celular. Otra limitación está relacionada con la medición de la CCGRs, ya que el equipo realiza las mediciones de forma automática, sin permitir la segmentación de la imagen, lo que podría introducir un sesgo subjetivo.

Las mediciones histológicas también presentan una limitación importante, ya que se realizaron de manera manual, lo que requiere mucho tiempo y puede introducir sesgos subjetivos. Además, la falta de planos de montaje completo de la retina teñidos con tinciones específicas para las células ganglionares muertas dificultó la cuantificación precisa de la muerte celular en el modelo de HO y su correlación con el trasplante celular. Al comparar los análisis con el grupo control, se observó que muchos resultados no mostraron diferencias estadísticamente significativas, incluso en animales que presentaban lesiones evidentes. Esta falta de significancia podría atribuirse al pequeño tamaño de la muestra y a la variabilidad en la distribución del criterio de puntuación utilizado para evaluar las lesiones.

La interpretación de los resultados de la respuesta pupilar fotocromática (RPF) a la luz roja también se vio limitada por las diferencias anatómicas entre los animales del estudio y los seres humanos. Aunque el flash-VEP proporcionó información sobre las CGRs y la función del nervio óptico, habría sido beneficioso complementar estas mediciones con electrorretinografía de campo completo (ff-ERG) para obtener directamente la función de los fotorreceptores y las células bipolares. El uso combinado de flash-VEP y ff-ERG habría proporcionado mayor seguridad de que las WJ-MSCs no dañan la función de la retina. Finalmente, la evaluación de los niveles de citoquinas se vio limitada por problemas técnicos con los kits de ELISA, lo que resultó en la pérdida de algunas muestras de humor acuoso y humor vítreo de la primera semana del estudio. Esto redujo el número de citoquinas evaluadas en esa semana y, por lo tanto, el tamaño de la muestra disponible para análisis. Estas limitaciones deben tenerse en cuenta al interpretar los resultados y pueden proporcionar áreas para futuras investigaciones y mejoras metodológicas.

CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en nuestro estudio podemos deducir las siguientes conclusiones:

1. El modelo de HO desarrollado mediante la administración de glucocorticoides tópicos y subconjuntivales en conejos demostró similitudes clínicas, morfológicas y funcionales con el glaucoma primario de ángulo abierto en humanos. Esta asociación permitió inducir una HO temprana, consistente y sostenida, sin causar molestias significativas en los ojos de los animales.
2. El trasplante de WJ-MSCs en el modelo experimental mostró un perfil de seguridad favorable, con pocos eventos adversos.
3. Se observó que los cambios inducidos por la HO pueden ser detectados precozmente mediante la técnica de RPF, lo que sugiere su utilidad en la detección y seguimiento del glaucoma.
4. Las WJ-MSCs no fueron capaces de restablecer la función de las células ganglionares de la retina y del nervio óptico.
5. La OCT demostró ser un método no invasivo y seguro para evaluar los cambios morfológicos en la capa de células ganglionares de la retina en respuesta al trasplante de WJ-MSCs.
6. Las WJ-MSCs no lograron restablecer el grosor de la capa de fibras nerviosas de la retina.
7. El estudio histopatológico de la retina y el nervio óptico después de inducir la HO reveló alteraciones citoarquitecturales características del glaucoma.
8. Los animales que recibieron WJ-MSCs presentaron menos alteraciones en la retina y nervio óptico en comparación al grupo de HO, incluida una mayor tendencia a conservar capa de células ganglionares de la retina observadas por histología, lo que sugiere un efecto beneficioso de la terapia celular.
9. Se observó una mejora en la RPF a la luz azul en el grupo de HO que recibió WJ-MSCs, lo que podría indicar un posible efecto neuroprotector y axogénico de la terapia celular sobre las células ganglionares de la retina.
10. Las WJ-MSCs contribuyen a la generación de un ambiente inmunosupresor mediante la inhibición de los linfocitos T proinflamatorias y la producción de citoquinas reguladoras, como el TGF-β.
11. Se evidenció un potencial efecto inmunomodulador de las WJ-MSCs sobre los linfocitos $TCD4^{+}$, lo que podría resultar en una protección neuronal en la capa de células ganglionares de la retina.

12. Se observó una intensa infiltración de linfocitos $TCD8^+$ en varias capas de la retina, sugiriendo la mediación de la inmunidad celular en la neuropatía óptica glaucomatosa.

REFERENCIAS

1. Martin PB, Vila PCF. Estudio de la dinámica del humor acuoso mediante fluorofotometría en el glaucoma de ángulo abierto. Universidad Complutense de Madrid; 1991.

2. Braunger BM, Fuchshofer R, Tamm ER. The aqueous humor outflow pathways in glaucoma: A unifying concept of disease mechanisms and causative treatment. Eur J Pharm Biopharm. 2015 Sep;95(Pt B):173–81.

3. Cravioto B, RO, Massieu H G, Izquierdo JJ. Análisis y separación cromatográfica en papel filtro de los componentes del humor acuoso y del plasma desproteinizados de conejo, que dan reacción colorida con la Nihidrina. Anales de la Sociedad Mexicana de Oftalmología,. 1951;25(2):63–76.

4. Sayans Gómez JÁ. Estudio instrumental de la respuesta inflamatoria en la cirugía de la catarata [Internet]. [España]: Universidad de Alicante. Facultad de Medicina; 1996. Available from: http://hdl.handle.net/10045/4045

5. Abad Adán E. Caracterización de la entrada de Ca2+" capacitativa" en células trabeculares. Universitat de Barcelona; 2009.

6. Gómez RG, Martín MG. Vías de drenaje del humor acuoso. La vía subconjuntival. Cirugía microincisional del glaucoma. Cirugía microincisional del glaucoma. 2016;53.

7. Goel M, Picciani RG, Lee RK, Bhattacharya SK. Aqueous humor dynamics: a review. The open ophthalmology journal. 2010;4:52.

8. Casson RJ, Chidlow G, Wood JP, Crowston JG, Goldberg I. Definition of glaucoma: clinical and experimental concepts: Definition of glaucoma. Clinical & Experimental Ophthalmology. 2012 May;40(4):341–9.

9. Yadav I, Purohit SD, Singh H, Bhushan S, Yadav MK, Velpandian T, et al. Vitreous substitutes: An overview of the properties, importance, and development. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2021 Aug;109(8):1156–76.

10. Curran JE, Jowett JBM, Elliott KS, Gao Y, Gluschenko K, Wang J, et al. Genetic variation in selenoprotein S influences inflammatory response. Nature Genetics. 2005 Nov;37(11):1234–41.

11. Kim TW, Kang KB, Choung HK, Park KH, Kim DM. Elevated glutamate levels in the vitreous body of an in vivo model of optic nerve ischemia. Archives of Ophthalmology. 2000;118(4):533–6.

12. Vorwerk CK, Naskar R, Schuettauf F, Quinto K, Zurakowski D, Gochenauer G, et al. Depression of retinal glutamate transporter function leads to elevated intravitreal glutamate levels and ganglion cell death. Investigative ophthalmology & visual science. 2000;41(11):3615–21.

13. Jager RD, Aiello LP, Patel SC, Cunningham E. Risks of intravitreous injection: a comprehensive review. Retina. 2004;24(5):676–98.

14. Maceira Rozas MC, Cantero Muñoz. Inyecciones intravítreas. Efectividad y seguridad en función del lugar del procedimiento - PDF [Internet]. Santiago de Compostela: Agencia Gallega para la Gestión del Conocimiento en Salud, Unidad de Asesoramiento Científico-técnico,; 2016 [cited 2019 Mar 21]. Available from: https://docplayer.es/50555288-Inyecciones-intravitreas-efectividad-y-seguridad-en-funcion-del-lugar-del-procedimiento.html

15. David Hubel. Ojo, Cerebro y Vision [Internet]. Murcia: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Murcia. Vol. 1. Murcia: Murcia: Servicio de Publicaciones; 2019 [cited 2019 Mar 8]. 33-58. p. Available from: https://www.casadellibro.com/libro-ojo-cerebro-y-vision/9788483711026/695795

16. Mannu GS. Retinal phototransduction. Neurosciences (Riyadh). 2014 Oct;19(4):275–80.

17. Boll PF. On the anatomy and physiology of the retina. Vision Research. 1977 Jan 1;17(11):1249–65.

18. Gelatt Kirk. Veterinary Ophthalmology: Ophthalmic Anatomy [Internet]. 4ed ed. Vol. 1. USA: Blackwell Publishing; 2007 [cited 2019 Mar 8]. 37–148 p. Available from: https://www.wiley.com/en-us/Veterinary+Ophthalmology%3A+Two+Volume+Set%2C+5th+Edition-p-9780470960400

19. Ramírez JM, Ramírez AI, Salazar JJ, de Hoz R, Triviño A. Changes of astrocytes in retinal ageing and age-related macular degeneration. Experimental eye research. 2001;73(5):601–15.

20. Febrer AM. Caracterización funcional, estructural y molecular del modelo de glaucoma crónico experimental basado en la inyección intracamerular de ácido hialurónico en la rata [Tesis Doctoral]. [Valencia]: Universidad Cardenal Herrera CEU; 2013.

21. António Ramalho. Retina. In: António Ramalho | Enciclopédia de Oftalmologia António Ramalho [Internet]. 2014 [cited 2019 Mar 8]. Available from: http://www.antonioramalho.com/pagina.asp?ID=239

22. Dolz-Marco R. Evaluación preclínica de la toxicidad retiniana en la administración intravítrea de ácido docosahexaenoico en modelo experimental de conejo [Tesis Doctoral]. [Valencia]: Universitat do Valencia; 2013.

23. Cristina Nieto Gómez. Efecto de las células mesenquimales sobre el segmento posterior del ojo en un modelo experimental de enfermedad de injerto contra huesped ocular [Internet] [Tesis Doctoral]. [Salamanca]: Universidad de Salamanca; 2016 [cited 2019 Jun 24]. Available from: https://gredos.usal.es/handle/10366/133001

24. Rodríguez L, Herbania Y. Algunas consideraciones sobre la fisiopatología del glaucoma. Revista Cubana de Oftalmología. 2007 Dec;20(2):0–0.

25. Luna-Martínez I, Brechtel-Bindel M, de la Fuente-Torres MA. Relación del espesor corneal central y la variación en la presión intraocular con daño al nervio óptico en pacientes mexicanos con glaucoma. Revista Mexicana de Oftalmología. 2009;83(4):193–6.

26. Fujitani Y, Fujitani S, Luo H, Qiu F, Burlison J, Long Q, et al. Ptf1a determines horizontal and amacrine cell fates during mouse retinal development. Development. 2006 Nov;133(22):4439–50.

27. Czeh M, Gressens P, Kaindl AM. The yin and yang of microglia. Developmental neuroscience. 2011;33(3–4):199–209.

28. Gil MAN. Activación de la microglía en la degeneración de la retina y su modulación mediante agentes antiapoptóticos e inflamatorios [Tesis Doctoral]. [España]: Universidad de Alicante; 2016.

29. Schnitzer J, Karschin A. The shape and distribution of astrocytes in the retina of the adult rabbit. Cell Tissue Res. 1986 Oct 1;246(1):91–102.

30. Norden DM, Trojanowski PJ, Villanueva E, Navarro E, Godbout JP. Sequential activation of microglia and astrocyte cytokine expression precedes increased iba-1 or GFAP immunoreactivity following systemic immune challenge. Glia. 2016;64(2):300–16.

31. Streit WJ, Graeber MB, Kreutzberg GW. Functional plasticity of microglia: a review. Glia. 1988;1(5):301–7.

32. Aloisi F. Immune function of microglia. Glia. 2001 Nov 1;36(2):165–79.

33. Osborne NN. Pathogenesis of ganglion “cell death” in glaucoma and neuroprotection: focus on ganglion cell axonal mitochondria. Progress in brain research. 2008;173:339–52.

34. Naydú Acosta Ramírez, Rolando Enrique Peñaloza, Jesús Rodríguez García. Carga de enfermedad colombia 2005: resultados alcanzados. Bogotá: Pontífica Universidad Javeriana; 2008 p. 94. (Cendex).

35. Payne AJ, Kaja S, Sabates NR, Koulen P. Neuroprotection in Eye Disease: Developments in Translational Research. Mo Med. 2013;110(5):429–36.

36. Bailey AJ, Paul RG, Knott L. Mechanisms of maturation and ageing of collagen. Mechanisms of ageing and development. 1998;106(1–2):1–56.

37. Palko JR, Morris HJ, Pan X, Harman CD, Koehl KL, Gelatt KN, et al. Influence of age on ocular biomechanical properties in a canine glaucoma model with ADAMTS10 mutation. PloS one. 2016;11(6):e0156466.

38. Downs JC. Optic nerve head biomechanics in aging and disease. Experimental Eye Research. 2015 Apr;133:19–29.

39. Doucette LP, Rasnitsyn A, Seifi M, Walter MA. The interactions of genes, age, and environment in glaucoma pathogenesis. Survey of Ophthalmology. 2015 Jul;60(4):310–26.

40. Liu B, McNally S, Kilpatrick JI, Jarvis SP, O'Brien CJ. Aging and ocular tissue stiffness in glaucoma. Survey of Ophthalmology. 2018 Jan;63(1):56–74.

41. Heijl A, Leske MC, Bengtsson B, Hyman L, Bengtsson B, Hussein M. Reduction of intraocular pressure and glaucoma progression: results from the Early Manifest Glaucoma Trial. Archives of ophthalmology. 2002;120(10):1268–79.

42. Casson RJ. Possible role of excitotoxicity in the pathogenesis of glaucoma. Clinical and Experimental Ophthalmology. 2006 Jan;34(1):54–63.

43. Takai Y, Tanito M, Ohira A. Multiplex Cytokine Analysis of Aqueous Humor in Eyes with Primary Open-Angle Glaucoma, Exfoliation Glaucoma, and Cataract. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2012 Jan 1;53(1):241–7.

44. Adio Adedayo Omobolanle, Onua. Economic burden of glaucoma in Rivers State, Nigeria. Clinical Ophthalmology. 2012 Dec;2023.

45. Ozcan AA, Ozdemir N, Canataroglu A. The aqueous levels of TGF-β2 in patients with glaucoma. International ophthalmology. 2004;25(1):19–22.

46. Morrison JC, Moore CG, Deppmeier LM, Gold BG, Meshul CK, Johnson EC. A rat model of chronic pressure-induced optic nerve damage. Experimental eye research. 1997;64(1):85–96.

47. Garcia-Valenzuela E, Shareef S, Walsh J, Sharma SC. Programmed cell death of retinal ganglion cells during experimental glaucoma. Experimental eye research. 1995;61(1):33–44.

48. Evangelho K, Mogilevskaya M, Losada-Barragan M, Vargas-Sanchez JK. Pathophysiology of primary open-angle glaucoma from a neuroinflammatory and neurotoxicity perspective: a review of the literature. Int Ophthalmol. 2017 Dec 30;1–13.

49. Lucas DR, Newhouse JP. The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. AMA archives of ophthalmology. 1957;58(2):193–201.

50. Sappington RM, Sidorova T, Long DJ, Calkins DJ. TRPV1: contribution to retinal ganglion cell apoptosis and increased intracellular Ca2+ with exposure to hydrostatic pressure. Investigative ophthalmology & visual science. 2009;50(2):717–28.

51. Huang W, Fileta J, Rawe I, Qu J, Grosskreutz CL. Calpain Activation in Experimental Glaucoma. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2010 Jun 1;51(6):3049–54.

52. DORADO MARTÍNEZ C, RUGERIO VARGAS C, SELVA RIVAS A. Estrés oxidativo y neurodegeneración. Revista de la Facultad de Medicina. 2003;46(006).

53. Zanon-Moreno V, Melo P, Mendes-Pinto MM, Alves CJ, Garcia-Medina JJ, Vinuesa-Silva I, et al. Serotonin levels in aqueous humor of patients with primary open-angle glaucoma. Molecular vision. 2008;14:2143.

54. Haefliger IO, Dettmann E, Liu R, Meyer P, Prünte C, Messerli J, et al. Potential role of nitric oxide and endothelin in the pathogenesis of glaucoma. Survey of ophthalmology. 1999;43:S51–8.

55. Purves D, editor. Neuroscience. 3rd ed. Sunderland, Mass: Sinauer Associates, Publishers; 2004. 832 p. (1; vol. 1).

56. Álvarez Bulnes O. Descripción y análisis del grosor de la capa de fibras nerviosas retinianas obtenidos mediante tomografía de coherencia óptica en pacientes sometidos a cirugía combinada de glaucoma [Tesis Doctoral]. [Barcelona]: Universidad Autónoma de Barcelona; 2011.

57. Sanz MS. Influencia de la Córnea en la medida de la presión intraocular con distintos sistemas tonométricos. Universidad de Alcalá; 2010.

58. Barrancos Julián C. Cambios biomecánicos de la cabeza del nervio óptico tras esclerectomía profunda no perforante valorados mediante tomografía de dominio espectral con tecnología" Enhanced Depth Imaging" [Tesis Doctoral]. [España]: Universidad de Alcalá; 2014.

59. Salinas Navarro MÁ. Efecto de la hipertensión ocular en la población de células ganglionares de la retina de rata y ratón. Universidad de Murcia; 2011.

60. Ibañez-García A. OCT vs Perimetría Computerizada en Glaucoma [Internet]. [Málaga]: Universidad de Málaga; 2015. Available from: http://hdl.handle.net/10630/10147

61. Kanski JJ, Fontenla JR. Diagnóstico clínico en oftalmología. 1st ed. Madrid: Elsevier,; 2007.

62. Kass MA, Heuer DK, Higginbotham EJ, Johnson CA, Keltner JL, Miller JP, et al. The Ocular Hypertension Treatment Study: a randomized trial determines that topical ocular hypotensive medication delays or prevents the onset of primary open-angle glaucoma. Archives of ophthalmology. 2002;120(6):701–13.

63. Armaly MF. Ocular pressure and visual fields: A ten-year follow-up study. Archives of ophthalmology. 1969;81(1):25–40.

64. Pinazo-Durán MD. Genética y algo más. Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología. 2012;87(2):35–7.

65. Gonzalez P, Epstein DL, Borrás T. Genes Upregulated in the Human Trabecular Meshwork in Response to Elevated Intraocular Pressure. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2000 Feb 1;41(2):352–61.

66. Gabelt BT, Kaufman PL. Changes in aqueous humor dynamics with age and glaucoma. Progress in retinal and eye research. 2005;24(5):612–37.

67. Li G, Lee C, Agrahari V, Wang K, Navarro I, Sherwood JM, et al. In vivo measurement of trabecular meshwork stiffness in a corticosteroid-induced ocular hypertensive mouse model. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2019 Jan 29;116(5):1714–22.

68. Jain A, Wordinger RJ, Yorio T, Clark AF. Role of the Alternatively Spliced Glucocorticoid Receptor Isoform GRβ in Steroid Responsiveness and Glaucoma. Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics. 2014 Mar;30(2–3):121–7.

69. Wordinger RJ, Clarka AF. Effects of glucocorticoids on the trabecular meshwork: towards a better understanding of glaucoma. Progress in retinal and eye research. 1999;18(5):629–67.

70. Becker B. Intraocular pressure response to topical corticosteroids. Investigative Ophthalmology & Visual Science. 1965;4(2):198–205.

71. Bernstein HN, Schwartz B. Effects of Long-Term Systemic Steroids on Ocular Pressure and Tonographic Values. Archives of Ophthalmology. 1962 Dec 1;68(6):742–53.

72. Zhang X, Ognibene CM, Clark AF, Yorio T. Dexamethasone inhibition of trabecular meshwork cell phagocytosis and its modulation by glucocorticoid receptor β. Experimental Eye Research. 2007;84(2):275–84.

73. Overby DR, Bertrand J, Tektas OY, Boussommier-Calleja A, Schicht M, Ethier CR, et al. Ultrastructural changes associated with dexamethasone-induced ocular hypertension in mice. Investigative ophthalmology & visual science. 2014;55(8):4922–33.

74. Qin Y, Lam S, Yam GHF, Choy KW, Liu DTL, Chiu TYH, et al. A rabbit model of age-dependant ocular hypertensive response to topical corticosteroids. Acta Ophthalmologica. 2012 Sep 1;90(6):559–63.

75. Ticho U, Lahav M, Berkowitz S, Yoffe P. Ocular changes in rabbits with corticosteroid-induced ocular hypertension. British Journal of Ophthalmology. 1979 Sep 1;63(9):646–50.

76. Kasetti RB, Maddineni P, Patel PD, Searby C, Sheffield VC, Zode GS. Transforming growth factor β2 (TGFβ2) signaling plays a key role in glucocorticoid-induced ocular hypertension. J Biol Chem. 2018 22;293(25):9854–68.

77. Knepper PA, Farbman AI, Telser AG. Aqueous outflow pathway glycosaminoglycans. Experimental eye research. 1981;32(3):265–77.

78. Ke TL, Clark AF, Gracy RW. Age-related permeability changes in rabbit corneas. J Ocul Pharmacol Ther. 1999 Dec;15(6):513–23.

79. Hohenstein-Blaul NVTU, Bell K, Pfeiffer N, Grus FH. Autoimmune aspects in glaucoma. European journal of pharmacology. 2016;787:105–18.

80. Mowatt G, Burr JM, Cook JA, Siddiqui MR, Ramsay C, Fraser C, et al. Screening tests for detecting open-angle glaucoma: systematic review and meta-analysis. Investigative ophthalmology & visual science. 2008;49(12):5373–85.

81. Quigley HA, McKinnon SJ, Zack DJ, Pease ME, Kerrigan–Baumrind LA, Kerrigan DF, et al. Retrograde axonal transport of BDNF in retinal ganglion cells is blocked by acute IOP elevation in rats. Investigative ophthalmology & visual science. 2000;41(11):3460–6.

82. M. C. B. Héctor Esparza Leal. La Oftalmoscopia Directa [Internet]. 2009 [cited 2019 Mar 21]. Available from: https://es.scribd.com/doc/22870222/La-Oftalmoscopia-Directa

83. Marvin Barahona. 1. tecnicas para visualizar la retina [Internet]. 00:46:59 UTC [cited 2019 Mar 21]. Available from: https://es.slideshare.net/Marvin_Barahona/1-tecnicas-para-visualizar-la-retina

84. Theodossiades J, Murdoch I. What optic disc parameters are most accurately assessed using the direct ophthalmoscope? Eye. 2001 May 1;15:283.

85. Douglas J. Rhee. Manual MSD versión para profesionales. 2017 [cited 2019 Mar 21]. Glaucoma primario de ángulo abierto - Trastornos oftálmicos. Available from: https://www.msdmanuals.com/es-cl/professional/trastornos-oft%C3%A1lmicos/glaucoma/glaucoma-primario-de-%C3%A1ngulo-abierto

86. Strouthidis NG, Grimm J, Williams GA, Cull GA, Wilson DJ, Burgoyne CF. A comparison of optic nerve head morphology viewed by spectral domain optical coherence tomography and by serial histology. Investigative ophthalmology & visual science. 2010;51(3):1464–74.

87. Huang D, Swanson EA, Lin CP, Schuman JS, Stinson WG, Chang W, et al. Optical coherence tomography. science. 1991;254(5035):1178–81.

88. Tai TYT. Visual Evoked Potentials and Glaucoma. Asia Pac J Ophthalmol (Phila). 2018;7(5):352–5.

89. Hood DC, Greenstein VC. Multifocal VEP and ganglion cell damage: applications and limitations for the study of glaucoma. Prog Retin Eye Res. 2003 Mar;22(2):201–51.

90. Meigen T. [Electrophysiology in ophthalmology]. Ophthalmologe. 2015 Jun;112(6):533–44; quiz 545–6.

91. Firan AM, Iancu RC, Bujor IA, Ciuluvică RC, Tudosescu R, Ungureanu E, et al. The role of Visual Evoked Potential (VEP) in monitoring the progression and in guiding the treatment of glaucoma patients with poor compliance. Rom J Ophthalmol. 2020;64(2):205–12.

92. Kardon R, Anderson SC, Damarjian TG, Grace EM, Stone E, Kawasaki A. Chromatic Pupil Responses. Ophthalmology. 2009 Aug;116(8):1564–73.

93. Yeh CY, Koehl KL, Harman CD, Iwabe S, Guzman JM, Petersen-Jones SM, et al. Assessment of rod, cone, and intrinsically photosensitive retinal ganglion cell contributions to the canine chromatic pupillary response. Investigative ophthalmology & visual science. 2017;58(1):65–78.

94. Berson DM, Dunn FA, Takao M. Phototransduction by Retinal Ganglion Cells That Set the Circadian Clock. Science. 2002 Feb 8;295(5557):1070–3.

95. Grozdanic SD, Kecova H, Lazic T. Rapid diagnosis of retina and optic nerve abnormalities in canine patients with and without cataracts using chromatic pupil light reflex testing. Veterinary Ophthalmology. 2013 Sep 1;16(5):329–40.

96. Güler AD, Ecker JL, Lall GS, Haq S, Altimus CM, Liao HW, et al. Melanopsin cells are the principal conduits for rod–cone input to non-image-forming vision. Nature. 2008 May;453(7191):102–5.

97. Qiu X, Kumbalasiri T, Carlson SM, Wong KY, Krishna V, Provencio I, et al. Induction of photosensitivity by heterologous expression of melanopsin. Nature. 2005 Feb;433(7027):745–9.

98. Porciatti V, Di Bartolo E, Nardi M, Fiorentini A. Responses to chromatic and luminance contrast in glaucoma: a psychophysical and electrophysiological study. Vision research. 1997;37(14):1975–87.

99. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S, Baker DL. Cellular and molecular immunology. Tenth edition. Philadelphia, Pennsylvania: Elsevier; 2022. 587 p.

100. Gomez-Lucí E, Cutuli MT, Collado VM. El sistema inmune innato. RCCV. 2008;2(1):16.

101. Rojas WM, Juan-Manuel Anaya C, Luz Elena Cano R, Aristizábal B, Luis Miguel Gómes O, Lopera D. Inmunología de Rojas. 17th ed. Medellin, Colombia: Corporacion para Investigaciones Biologicas (CIB); 2015. 592 p.

102. Torre A de L. Inmunología ocular: síndromes de ojo seco. Colombia Médica. 2002;33(3):10.

103. Muñoz Silvestre A, Corpa Arenas JM, Viana Martín D. Caracterización inmunopatológica de un modelo de infección experimental intradérmica por “Staphylococcus aureus” en conejos / tesis doctoral presentada por Asunción Muñoz Silvestre ; dirigida por [el] Dr. D. Juan Manuel Corpa Arenas [y el] Dr. D. David Viana Martín. 2019 Apr 3 [cited 2019 Jun 24]; Available from: https://repositorioinstitucional.ceu.es/handle/10637/10112

104. Toche P. Visión panorámica del sistema inmune | Elsevier Enhanced Reader. RevMedClinCondes. 2012;23(4):11.

105. Marcos Todone. Rol de las proteínas de reconocimiento de peptidoglicanos (PGRPs) en el sistema inmune innato [Tesis Doctoral]. [Buenos Aires]: Universidad de Buenos Aires; 2015.

106. Aparicio P. Respuesta inmune de base celular y mecanismos de activación celular. Gómez-Lucía E, et al Manual de Inmunología Veterinaria Madrid Pearson Educación. 2007;

107. López-Martínez A, Chávez-Muñoz C, Granados J. Función biológica del complejo principal de histocompatibilidad. Revista de investigación clínica. 2005 Apr;57(2):132–41.

108. Day MJ. Clinical immunology of the dog and cat. 2nd ed. London: Manson Publishing; 2011. 390 p.

109. Hoecker G. Major Histocompatibility Complex: A System for the Specific Modulation of Differentiated Cells? Scandinavian Journal of Immunology. 1991;33(3):243–6.

110. Anderson MG, Hawes NL, Trantow CM, Chang B, John SWM. Iris phenotypes and pigment dispersion caused by genes influencing pigmentation: Iris phenotypes of mice. Pigment Cell & Melanoma Research. 2008 Oct;21(5):565–78.

111. Raff MC. T and B Lymphocytes and Immune Responses. Nature. 1973 Mar;242(5392):19.

112. Greaves MF, Owen JJ, Raff MC. T and B lymphocytes: origins, properties and roles in immune responses. Excerpta medica; 1974.

113. Hendrix S, Nitsch R. The role of T helper cells in neuroprotection and regeneration. J Neuroimmunol. 2007 Mar;184(1–2):100–12.

114. Liang JK, Hu L, Zheng XF. Study of Th1/Th2 balance in peripheral blood of chronic gastritis patients with Pi-Wei damp-heat syndrome. Zhongguo Zhong xi yi jie he za zhi Zhongguo Zhongxiyi jiehe zazhi= Chinese journal of integrated traditional and Western medicine. 2012;32(3):322–4, 328.

115. Davis WC, Hamilton MJ. Comparison of the unique characteristics of the immune system in different species of mammals. Veterinary Immunology and Immunopathology. 1998 May;63(1–2):7–13.

116. Streilein JW. Ocular immune privilege: therapeutic opportunities from an experiment of nature. Nature Reviews Immunology. 2003 Nov;3(11):879–89.

117. Stein-Streilein J. Immune regulation and the eye. Trends in Immunology. 2008 Nov;29(11):548–54.

118. Goslings WR, Prodeus AP, Streilein JW, Carroll MC, Jager MJ, Taylor AW. A small molecular weight factor in aqueous humor acts on C1q to prevent antibody-dependent complement activation. Investigative Ophthalmology & Visual Science. 1998 May 1;39(6):989–95.

119. Apte RS, Sinha D, Mayhew E, Wistow GJ, Niederkorn JY. Cutting edge: role of macrophage migration inhibitory factor in inhibiting NK cell activity and preserving immune privilege. J Immunol. 1998 Jun 15;160(12):5693–6.

120. Streilein JW. Ocular immune privilege: the eye takes a dim but practical view of immunity and inflammation. Journal of Leukocyte Biology. 2003;74(2):179–85.

121. Taylor AW. Ocular immune privilege. Eye. 2009 Oct;23(10):1885–9.

122. Sugita S, Futagami Y, Smith SB, Naggar H, Mochizuki M. Retinal and ciliary body pigment epithelium suppress activation of T lymphocytes via transforming growth factor beta. Experimental Eye Research. 2006 Dec;83(6):1459–71.

123. Tsukahara R, Takeuchi M, Akiba H, Kezuka T, Takeda K, Usui Y, et al. Critical contribution of CD80 and CD86 to induction of anterior chamber-associated immune deviation. Int Immunol. 2005 May 1;17(5):523–30.

124. Griffith TS, Yu X, Herndon JM, Green DR, Ferguson TA. CD95-Induced Apoptosis of Lymphocytes in an Immune Privileged Site Induces Immunological Tolerance. Immunity. 1996 Jul;5(1):7–16.

125. Taylor AW. Ocular Immune Privilege and Transplantation. Front Immunol [Internet]. 2016 [cited 2019 Jun 12];7. Available from: http://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2016.00037/full

126. Rj S, Pg M, Pg H. Resident tissue macrophages within the normal rat iris lack immunosuppressive activity and are effective antigen-presenting cells. Ocular immunology and inflammation [Internet]. 2000 Sep [cited 2021 Nov 7];8(3). Available from: http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11120579/

127. Steptoe RJ, Holt PG, McMenamin PG. Functional studies of major histocompatibility class II-positive dendritic cells and resident tissue macrophages isolated from the rat iris. Immunology. 1995 Aug;85(4):630.

128. Steptoe RJ, McMenamin PG, Holt PG. Resident tissue macrophages within the normal rat iris lack immunosuppressive activity and are effective antigen-presenting cells. Ocular Immunology and Inflammation [Internet]. 2009 Jul 8 [cited 2021 Nov 7]; Available from: https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1076/0927-3948%28200009%29831-KFT177

129. A J, B K, G O, A AS, Vg S, Dl H, et al. Plasmacytoid dendritic cells in the eye. Progress in retinal and eye research [Internet]. 2021 Jan [cited 2021 Nov 7];80. Available from: http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32717378/

130. Facchetti F, Wolf-Peeters C de, Mason DY, Pulford K, Oord JJ van den, Desmet VJ. Plasmacytoid T cells. Immunohistochemical evidence for their monocyte/macrophage origin. The American Journal of Pathology. 1988 Oct;133(1):15.

131. Cox K, North M, Burke M, Singhal H, Renton S, Aqel N, et al. Plasmacytoid dendritic cells (PDC) are the major DC subset innately producing cytokines in human lymph nodes. Journal of Leukocyte Biology. 2005 Nov 1;78(5):1142–52.

132. Decalf J, Fernandes S, Longman R, Ahloulay M, Audat F, Lefrerre F, et al. Plasmacytoid dendritic cells initiate a complex chemokine and cytokine network and are a viable drug target in chronic HCV patients. J Exp Med. 2007 Oct 1;204(10):2423–37.

133. Doyle EH, Rahman A, Aloman C, Klepper AL, El-Shamy A, Eng F, et al. Individual liver plasmacytoid dendritic cells are capable of producing IFNα and multiple additional cytokines during chronic HCV infection. PLOS Pathogens. 2019 Jul 29;15(7):e1007935.

134. Tokita D, Sumpter TL, Raimondi G, Zahorchak AF, Wang Z, Nakao A, et al. Poor allostimulatory function of liver plasmacytoid DC is associated with pro-apoptotic activity, dependent on regulatory T cells. Journal of Hepatology. 2008 Dec;49(6):1008–18.

135. Pais R, Bhowmick S, Chattopadhyay S, Lemire Y, Sharafieh R, Yadav R, et al. An Intracameral Injection of Antigen Induces In Situ Chemokines and Cytokines Required for the Generation of Circulating Immunoregulatory Monocytes. PLOS ONE. 2012 Aug 17;7(8):e43182.

136. Martínez MCJ, Carrera I, Seres MP, Jaimes M, Garfias Y. Inmunopatología de la uveítis: conocimientos actuales, correlación clínica y perspectivas de investigación en el área inmuno-ocular. 2006;11.

137. Wang Y, Goldschneider I, Foss D, Wu DY, O'Rourke J, Cone R. Direct thymic involvement in anterior chamber-associated immune deviation: evidence for a nondeletional mechanism of centrally induced tolerance to extrathymic antigens in adult mice. undefined [Internet]. 1997 [cited 2021 Nov 15]; Available from: https://www.semanticscholar.org/paper/Direct-thymic-involvement-in-anterior-immune-for-a-Wang-Goldschneider/d9b5b15027c82d46cff5465028fa9a7766abcbe4

138. Hori J, Yamaguchi T, Keino H, Hamrah P, Maruyama K. Immune privilege in corneal transplantation. Progress in Retinal and Eye Research. 2019 Apr;S1350946219300011.

139. Niederkorn JY. Role of NKT cells in anterior chamber-associated immune deviation. Expert review of clinical immunology. 2009 Mar;5(2):137.

140. Sonoda KH, Exley M, Snapper S, Balk SP, Stein-Streilein J. Cd1-Reactive Natural Killer T Cells Are Required for Development of Systemic Tolerance through an Immune-Privileged Site. The Journal of Experimental Medicine. 1999 Nov 1;190(9):1215.

141. Jh S, Ps B, Hj S, H M, Hj K, Ns B. Tolerance is dependent on complement C3 fragment iC3b binding to antigen-presenting cells. Nature medicine [Internet]. 2003 Feb [cited 2021 Nov 15];9(2). Available from: http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12514742/

142. Hm A, Jy N. Expansion of B cells is necessary for the induction of T-cell tolerance elicited through the anterior chamber of the eye. International archives of allergy and immunology [Internet]. 2007 [cited 2021 Nov 15];144(4). Available from: http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17671393/

143. Skelsey M, Mellon J, Niederkorn J. γδ T Cells Are Needed for Ocular Immune Privilege and Corneal Graft Survival1. undefined [Internet]. 2001 [cited 2021 Nov 15]; Available from: https://www.semanticscholar.org/paper/%CE%B3%CE%B4-T-Cells-Are-Needed-for-Ocular-Immune-Privilege-Skelsey-Mellon/0c70609451a5c6342311a1c57fbc18df4094865d

144. Ferguson TA, Herndon J, Elzey B, Griffith TS, Schoenberger S, Green DR. Uptake of Apoptotic Antigen-Coupled Cells by Lymphoid Dendritic Cells and Cross-Priming of CD8+ T Cells Produce Active Immune Unresponsiveness. The Journal of Immunology. 2002 Jun 1;168(11):5589–95.

145. Ramsdell F, Seaman MS, Miller RE, Picha KS, Kennedy MK, Lynch DH. Differential ability of Th1 and Th2 T cells to express Fas ligand and to undergo activation-induced cell death. Int Immunol. 1994 Oct 1;6(10):1545–53.

146. Xu X, Lai Y, Hua ZC. Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials. Biosci Rep. 2019 Jan 18;39(1):BSR20180992.

147. Zhao H, Liao X, Kang Y. Tregs: Where We Are and What Comes Next? Front Immunol [Internet]. 2017 Nov 24 [cited 2019 Jun 20];8. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5705554/

148. Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E. Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier. Nat Rev Neurosci. 2006 Jan;7(1):41–53.

149. Rabchevsky AG, Weinitz JM, Coulpier M, Fages C, Tinel M, Junier MP. A Role for Transforming Growth Factor α as an Inducer of Astrogliosis. J Neurosci. 1998 Dec 15;18(24):10541–52.

150. A B, T P, J G, M F, P W, Sn S, et al. Müller cells in the healthy and diseased retina. Progress in retinal and eye research [Internet]. 2006 Jul [cited 2021 Nov 8];25(4). Available from: http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16839797/

151. J S, J M, K VK, K M, F B, Y C, et al. Mechanisms of photoreceptor death and survival in mammalian retina. Progress in retinal and eye research [Internet]. 1999 Nov [cited 2021 Nov 8];18(6). Available from: http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10530749/

152. Tezel G, Wax MB. Increased production of tumor necrosis factor-α by glial cells exposed to simulated ischemia or elevated hydrostatic pressure induces apoptosis in cocultured retinal ganglion cells. Journal of Neuroscience. 2000;20(23):8693–700.

153. Vilhardt F. Microglia: phagocyte and glia cell. The international journal of biochemistry & cell biology. 2005;37(1):17–21.

154. Kreutzberg GW. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. Trends in neurosciences. 1996;19(8):312–8.

155. Tremblay MÈ, Lowery RL, Majewska AK. Microglial interactions with synapses are modulated by visual experience. PLoS biology. 2010;8(11):e1000527.

156. Rivest S. Regulation of innate immune responses in the brain. Nature Reviews Immunology. 2009;9(6):429.

157. Omri S, Behar-Cohen F, de Kozak Y, Sennlaub F, Verissimo LM, Jonet L, et al. Microglia/macrophages migrate through retinal epithelium barrier by a transcellular route in diabetic retinopathy: role of PKCζ in the Goto Kakizaki rat model. The American journal of pathology. 2011;179(2):942–53.

158. Giulian D, Li J, Li X, George J, Rutecki PA. The impact of microglia-derived cytokines upon gliosis in the CNS. Developmental neuroscience. 1994;16(3–4):128–36.

159. Vázquez-Chona FR, Swan A, Ferrell WD, Jiang L, Baehr W, Chien WM, et al. Proliferative reactive gliosis is compatible with glial metabolic support and neuronal function. BMC neuroscience. 2011;12(1):1–11.

160. Marc RE, Jones BW, Watt CB, Vazquez-Chona F, Vaughan DK, Organisciak D. Extreme retinal remodeling triggered by light damage: implications for age related macular degeneration. Molecular vision. 2008;14:782.

161. John GR, Lee SC, Brosnan CF. Cytokines: powerful regulators of glial cell activation. The Neuroscientist. 2003;9(1):10–22.

162. Zhang D, Hu X, Qian LI, Wilson B, Lee C, Flood P, et al. Prostaglandin E2 released from activated microglia enhances astrocyte proliferation in vitro. Toxicology and applied pharmacology. 2009;238(1):64–70.

163. Barnum SR. Inhibition of Complement as a Therapeutic Approach in Inflammatory Central Nervous System (CNS) Disease. Mol Med. 1999 Sep;5(9):569–82.

164. Rn A, Pk P, Jr L. Toll-like receptors in defense and damage of the central nervous system. Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology [Internet]. 2007 Dec [cited 2021 Nov 11];2(4). Available from: http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18040848/

165. T M, A C, Ra L, Kv T, R G. Astrocytes are less efficient in the removal of apoptotic lymphocytes than microglia cells: implications for the role of glial cells in the inflamed central nervous system. Journal of neuropathology and experimental neurology [Internet]. 2002 Sep [cited 2021 Nov 11];61(9). Available from: http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12230322/

166. Forrester JV, Xu H, Kuffová L, Dick AD, McMenamin PG. Dendritic cell physiology and function in the eye. Immunological Reviews. 2010 Mar 1;234(1):282–304.

167. Karlstetter M, Scholz R, Rutar M, Wong WT, Provis JM, Langmann T. Retinal microglia: Just bystander or target for therapy? Progress in Retinal and Eye Research. 2015 Mar 1;45:30–57.

168. Wong M, Huang P, Li W, Li Y, Zhang SS, Zhang C. T-Helper1/T-Helper2 Cytokine Imbalance in the Iris of Patients with Glaucoma. PLoS One [Internet]. 2015 Mar 26 [cited 2018 Oct 17];10(3). Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4374700/

169. Yang J, Patil RV, Yu H, Gordon M, Wax MB. T cell subsets and sIL-2R/IL-2 levels in patients with glaucoma. Am J Ophthalmol. 2001;131(4):421–6.

170. Streilein JW. Immunoregulatory mechanisms of the eye. Progress in retinal and eye research. 1999;18(3):357–70.

171. Poyomtip T. Role of Toll-Like Receptor 4 for cellular pathogenesis in Open-Angle Glaucoma: A Potential Therapeutic Strategy. Journal of Microbiology, Immunology and Infection. 2018;

172. Kokubun T, Tsuda S, Kunikata H, Yasuda M, Himori N, Kunimatsu-Sanuki S, et al. Characteristic Profiles of Inflammatory Cytokines in the Aqueous Humor of Glaucomatous Eyes. Ocular Immunology and Inflammation. 2018;26(8):1177–88.

173. Barany EH. In vitro studies of the resistance to flow through the angle of the anterior chamber. Acta Soc Med Ups. 1954 Mar 31;59(3–4):260–76.

174. J CD, Md R, Ia S. Glaucomatous cupping of the lamina cribrosa: a review of the evidence for active progressive remodeling as a mechanism. Experimental eye research [Internet]. 2011 Aug [cited 2021 Nov 12];93(2). Available from: http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20708001/

175. Taurone S, Ripandelli G, Pacella E, Bianchi E, Plateroti AM, De Vito S, et al. Potential regulatory molecules in the human trabecular meshwork of patients with glaucoma: Immunohistochemical profile of a number of inflammatory cytokines. Molecular Medicine Reports. 2015 Feb 1;11(2):1384–90.

176. Ha Q, Em A. Regional differences in the structure of the lamina cribrosa and their relation to glaucomatous optic nerve damage. Archives of ophthalmology (Chicago, Ill : 1960) [Internet]. 1981 Jan [cited 2021 Nov 12];99(1). Available from: http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7458737/

177. Jd P, Aw T, Cs R, I V, Mr H. Transforming growth factor beta isoforms in human optic nerve heads. The British journal of ophthalmology [Internet]. 1999 Feb [cited 2021 Nov 12];83(2). Available from: http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10396201/

178. Oa A, Cs R, M SS, Mr H. Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human optic nerve head astrocytes. Glia. 2001 Mar 1;33(3):205–16.

179. L G, Se M, Ra A, Rr A, Fw F, Mf C. Retinal ganglion cell apoptosis in glaucoma is related to intraocular pressure and IOP-induced effects on extracellular matrix. Investigative ophthalmology & visual science [Internet]. 2005 Jan [cited 2021 Nov 12];46(1). Available from: http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15623771/

180. Wein FB, Levin LA. Current understanding of neuroprotection in glaucoma. Current Opinion in Ophthalmology. 2002 Apr;13(2):61–7.

181. Serna-Ojeda JC, Flores-Reyes EM, Hartleben-Matkin C. Glaucoma: corrientes en estudio sobre su etiología. Gaceta Médica de México [Internet]. 2014 [cited 2017 Oct 4];150(3). Available from: http://www.medigraphic.com/pdfs/gaceta/gm-2014/gms143i.pdf

182. Gregory MS, Hackett CG, Abernathy EF, Lee KS, Saff RR, Hohlbaum AM, et al. Opposing Roles for Membrane Bound and Soluble Fas Ligand in Glaucoma-Associated Retinal Ganglion Cell Death. PLOS ONE. 2011 Mar 29;6(3):e17659.

183. Geyer O, Levo Y. Glaucoma is an autoimmune disease. Autoimmun Rev. 2020 Jun;19(6):102535.

184. Chen H, Cho KS, Vu THK, Shen CH, Kaur M, Chen G, et al. Commensal microflora-induced T cell responses mediate progressive neurodegeneration in glaucoma. Nat Commun. 2018;9(1):3209.

185. Ray K, Mookherjee S. Molecular complexity of primary open angle glaucoma: current concepts. Journal of genetics. 2009;88(4):451–67.

186. Tezel G, Yang X, Luo C, Kain AD, Powell DW, Kuehn MH, et al. Oxidative stress and the regulation of complement activation in human glaucoma. Investigative ophthalmology & visual science. 2010;51(10):5071–82.

187. Huang P, Zhang SSM, Zhang C. The two sides of cytokine signaling and glaucomatous optic neuropathy. 2009;6.

188. Huang P, Zhang SSM, Zhang C. The two sides of cytokine signaling and glaucomatous optic neuropathy. J Ocul Biol Dis Infor. 2009;2(2):78–83.

189. Redondo S, Santos-Gallego CG, Tejerina T. TGF-β1: a novel target for cardiovascular pharmacology. Cytokine & growth factor reviews. 2007;18(3–4):279–86.

190. Fisher J, Mizrahi T, Schori H, Yoles E, Levkovitch-Verbin H, Haggiag S, et al. Increased post-traumatic survival of neurons in IL-6-knockout mice on a background of EAE susceptibility. J Neuroimmunol. 2001;119(1):1–9.

191. Kennedy KJ, Karpus WJ. Role of chemokines in the regulation of Th1/Th2 and autoimmune encephalomyelitis. Journal of clinical immunology. 1999;19(5):273–9.

192. Agarwal SK, Marshall Jr GD. Stress effects on immunity and its application to clinical immunology. Clinical & Experimental Allergy. 2001;31(1):25–31.

193. Davis JL, Ruiz P, Shah M, Mandelcorn ED. Evaluation of the Reactive T-Cell Infiltrate in Uveitis and Intraocular Lymphoma with Flow Cytometry of Vitreous Fluid (An American Ophthalmological Society Thesis). Trans Am Ophthalmol Soc. 2012 Dec;110:117–29.

194. Husain S, Abdul Y, Webster C, Chatterjee S, Kesarwani P, Mehrotra S. Interferon-Gamma (IFN-γ)-Mediated Retinal Ganglion Cell Death in Human Tyrosinase T Cell Receptor Transgenic Mouse. Ahmad S, editor. PLoS ONE. 2014 Feb 28;9(2):e89392.

195. Duvesh R, Puthuran G, Srinivasan K, Rengaraj V, Krishnadas SR, Rajendrababu S, et al. Multiplex Cytokine Analysis of Aqueous Humor from the Patients with Chronic Primary Angle Closure Glaucoma. Current Eye Research. 2017 Dec 2;42(12):1608–13.

196. Campos M, Javier F. Implicaciones de la respuesta inmunológica en la retinopatía diabética y cuantificación de los mediadores de la re[s]puesta inflamatoria IL-1[beta], IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL12p70, IL-13, IL-17A, IL-22, IFN-[gamma] y TNF-[alfa], en suero y en pacientes vitrectomizados [Internet] [Tesis Doctoral]. [Alcalá de Henares]: Universidad de Alcalá; 2014 [cited 2019 Jun 24]. Available from: https://ebuah.uah.es/dspace/handle/10017/22710

197. Šedý J, Bekiaris V, Ware CF. Tumor necrosis factor superfamily in innate immunity and inflammation. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2014;7(4):a016279.

198. Dick AD, Forrester JV, Liversidge J, Cope AP. The role of tumour necrosis factor (TNF-α) in experimental autoimmune uveoretinitis (EAU). Progress in retinal and eye research. 2004;23(6):617–37.

199. Fuchs C, Forster V, Balse E, Sahel JA, Picaud S, Tessier LH. Retinal-Cell–Conditioned Medium Prevents TNF-α-Induced Apoptosis of Purified Ganglion Cells. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2005 Aug 1;46(8):2983–91.

200. Khalef N, Labib H, Helmy H, El Hamid MA, Moemen L, Fahmy I. Levels of cytokines in the aqueous humor of eyes with primary open angle glaucoma, pseudoexfoliation glaucoma and cataract. Electron Physician. 2017 Feb;9(2):3833–7.

201. Tezel G. TNF-α signaling in glaucomatous neurodegeneration. Progress in brain research. 2008;173:409–21.

202. Egwuagu CE, Mahdi RM, Chan CC, Sztein J, Li W, Smith JA, et al. Expression of interferon-gamma in the lens exacerbates anterior uveitis and induces retinal degenerative changes in transgenic Lewis rats. Clin Immunol. 1999 May;91(2):196–205.

203. Streilein JW, Wilbanks GA, Taylor A, Cousins S. Eye-derived cytokines and the immunosuppressive intraocular microenvironment: a review. Current Eye Research. 1992 Jan 1;11(sup1):41–7.

204. Wong M, Huang P, Li W, Li Y, Zhang SS, Zhang C. T-helper1/T-helper2 cytokine imbalance in the iris of patients with glaucoma. PLoS One. 2015;10(3):e0122184.

205. Peralta-Zaragoza O, Lagunas-Martínez A, Madrid-Marina V. Factor de crecimiento transformante beta-1: estructura, función y mecanismos de regulación en cáncer. Salud pública Méx. 2001 Aug;43(4):340–51.

206. Sporn MB, Roberts AB. Transforming growth factor-beta: recent progress and new challenges. J Cell Biol. 1992;119(5):1017–21.

207. Gupta D, Wen JC, Huebner JL, Stinnett S, Kraus VB, Tseng HC, et al. Cytokine biomarkers in tear film for primary open-angle glaucoma. Clin Ophthalmol. 2017 Feb 22;11:411–6.

208. Trivedi RH, Nutaitis M, Vroman D, Crosson CE. Influence of Race and Age on Aqueous Humor Levels of Transforming Growth Factor-Beta 2 in Glaucomatous and Nonglaucomatous Eyes. J Ocul Pharmacol Ther. 2011 Oct;27(5):477–80.

209. Pfeiffer N, Voykov B, Renieri G, Bell K, Richter P, Weigel M, et al. First-in-human phase I study of ISTH0036, an antisense oligonucleotide selectively targeting transforming growth factor beta 2 (TGF-β2), in subjects with open-angle glaucoma undergoing glaucoma filtration surgery. PLoS One [Internet]. 2017 Nov 30 [cited 2019 Jul 4];12(11). Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5708654/

210. Wang J, Harris A, Prendes M, Alshawa L, Gross J, Wentz S, et al. Targeting Transforming Growth Factor-β Signaling in Primary Open-Angle Glaucoma. Journal of Glaucoma. 2017;26(4):390–5.

211. Inoue-Mochita M, Inoue T, Kojima S, Futakuchi A, Fujimoto T, Sato-Ohira S, et al. Interleukin-6-mediated trans-signaling inhibits transforming growth factor-β signaling in trabecular meshwork cells. J Biol Chem. 2018 13;293(28):10975–84.

212. Fuchshofer R, Tamm ER. The role of TGF-β in the pathogenesis of primary open-angle glaucoma. Cell and Tissue Research. 2012 Jan;347(1):279–90.

213. Tamm ER, Ethier CR. Biological aspects of axonal damage in glaucoma: a brief review. Exp Eye Res. 2017 Apr;157:5–12.

214. Fakhraie G, Parvini F, Ghanavi J, Saif S, Farnia P. Association of IL-10 gene promoter polymorphisms with susceptibility to pseudoexfoliation syndrome, pseudoexfoliative and primary open-angle glaucoma. BMC Medical Genetics. 2020 Feb 12;21(1):32.

215. Irkec MT, Bozkurt B, Mesci L, Bulur B, Ersoy F, Sanal O, et al. TNF–alpha and IL–10 Gene Polymorphisms in Turkish Glaucoma Patients. Investigative Ophthalmology & Visual Science. 2005 May 1;46(13):27.

216. Casas LA, Gutiérrez AG. Asociación de polimorfismos genéticos de TNF-α e IL-10, citocinas reguladoras de la respuesta inmune en enfermedades infecciosas, alérgicas y autoinmunes. Vo l .

217. Ulhaq ZS, Soraya GV, Hasan YTN, Rachma LN, Rachmawati E, Shodry S, et al. Serum IL-6/IL-10 ratio as a biomarker for the diagnosis and severity assessment of primary-open angle glaucoma. European Journal of Ophthalmology. 2022 Jul 1;32(4):2259–64.

218. Erta M, Quintana A, Hidalgo J. Interleukin-6, a major cytokine in the central nervous system. Int J Biol Sci. 2012;8(9):1254–66.

219. Chen KH, Wu CC, Roy S, Lee SM, Liu JH. Increased Interleukin-6 in Aqueous Humor of Neovascular Glaucoma. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1999 Oct 1;40(11):2627–32.

220. Echevarria FD, Formichella CR, Sappington RM. Interleukin-6 Deficiency Attenuates Retinal Ganglion Cell Axonopathy and Glaucoma-Related Vision Loss. Front Neurosci [Internet]. 2017 May 31 [cited 2019 Jul 2];11. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5450377/

221. Chucair-Elliott AJ, Conrady C, Zheng M, Kroll CM, Lane TE, Carr DJJ. Microglia-induced IL-6 protects against neuronal loss following HSV-1 infection of neural progenitor cells. Glia. 2014 Sep;62(9):1418–34.

222. Wang JJ, Williams W, Wang B, Wei J, Lu X, Cheng JW, et al. Cytotoxic effect of interleukin-8 in retinal ganglion cells and its possible mechanisms. Int J Ophthalmol. 2018;11(8):1277–83.

223. Chono I, Miyazaki D, Miyake H, Komatsu N, Ehara F, Nagase D, et al. High interleukin-8 level in aqueous humor is associated with poor prognosis in eyes with open angle glaucoma and neovascular glaucoma. Scientific Reports. 2018 Sep 28;8(1):14533.

224. Gadue P, Huber TL, Nostro MC, Kattman S, Keller GM. Germ layer induction from embryonic stem cells. Experimental hematology. 2005;33(9):955–64.

225. Mol A, van Lieshout MI, Dam-de Veen CG, Neuenschwander S, Hoerstrup SP, Baaijens FP, et al. Fibrin as a cell carrier in cardiovascular tissue engineering applications. Biomaterials. 2005;26(16):3113–21.

226. Mauricio G, Guadalupe MR. Caracterización y evaluación del potencial terapéutico de células madre mesenquimales obtenidas de tejido adiposo en el tratamiento del infarto agudo de miocardio en modelo porcino [Tesis Doctoral]. [Salamanca]: Universidad de Salamanca; 2012.

227. Arnalich-Montiel F, Pastor S, Blazquez-Martinez A, Fernandez-Delgado J, Nistal M, Alio JL, et al. Adipose-Derived Stem Cells Are a Source for Cell Therapy of the Corneal Stroma. Stem Cells. 2008 Feb 1;26(2):570–9.

228. Arnalich Montiel F. Terapia celular aplicada a la regeneración del estroma corneal: uso de las células madre del tejdo adiposo en modelos experimentales [Internet] [Tesis Doctoral]. [Madrid]: Universidad Autónoma de Madrid. Departamento de Cirugía; 2008 [cited 2019 Jul 9]. Available from: RI: http://hdl.handle.net/10486/2044

229. Osathanon T, Linnes ML, Rajachar RM, Ratner BD, Somerman MJ, Giachelli CM. Microporous nanofibrous fibrin-based scaffolds for bone tissue engineering. Biomaterials. 2008;29(30):4091–9.

230. Linnes MP, Ratner BD, Giachelli CM. A fibrinogen-based precision microporous scaffold for tissue engineering. Biomaterials. 2007;28(35):5298–306.

231. Itali Marcelly Linero Segrera. Regeneracion osea por implante de celulas madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo humano en un modelo animal [Internet] [Tesis Doctoral]. [Bogota]: Universidad Nacional de Colombia; 2012. Available from: Codigo: 837006

232. Beltrán BR. Células madre mesenquimales equinas: Obtención y análisis de sus propiedades in vitro. :210.

233. Prósper F, Gavira JJ, Herreros J, Rábago G, Luquin R, Moreno J, et al. Cell transplant and regenerative therapy with stem cells. In: Anales del sistema sanitario de Navarra. 2006. p. 219–34.

234. Sabapathy V, Sundaram B, VM S, Mankuzhy P, Kumar S. Human Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells Plasticity Augments Scar-Free Skin Wound Healing with Hair Growth. PLoS One. 2014 Apr 15;9(4):e93726.

235. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. Stem Cells. 2006 May;24(5):1294–301.

236. Troyer DL, Weiss ML. Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. Stem Cells. 2008 Mar;26(3):591–9.

237. Subramanian A, Fong CY, Biswas A, Bongso A. Comparative Characterization of Cells from the Various Compartments of the Human Umbilical Cord Shows that the Wharton's Jelly Compartment Provides the Best Source of Clinically Utilizable Mesenchymal Stem Cells. PLoS One. 2015;10(6):e0127992.

238. Van der Garde M, Van Pel M, Millán Rivero JE, Graaf-Dijkstra A, Slot MC, Kleinveld Y, et al. Direct Comparison of Wharton's Jelly and Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells to Enhance Engraftment of Cord Blood CD34(+) Transplants. Stem Cells Dev. 2015 Nov 15;24(22):2649–59.

239. Drela K, Lech W, Figiel-Dabrowska A, Zychowicz M, Mikula M, Sarnowska A, et al. Enhanced neuro-therapeutic potential of Wharton's Jelly-derived mesenchymal stem cells in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells culture. Cytotherapy. 2016 Apr;18(4):497–509.

240. Gutiérrez-Fernández M, Otero-Ortega L, Ramos-Cejudo J, Rodríguez-Frutos B, Fuentes B, Díez-Tejedor E. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a strategy to improve recovery after stroke. Expert opinion on biological therapy. 2015;15(6):873–81.

241. Colgan SP, Eltzschig HK, Eckle T, Thompson LF. Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73). Purinergic Signal. 2006 Jun;2(2):351–60.

242. Kisselbach L, Fusiona M, Bossie A, Boyd A. Expresión de CD90 en células primarias humanas y eliminación de fibroblastos contaminantes de cultivos celulares. Citotecnología. 2009;59:31–44.

243. Cheifetz S, Bellón T, Calés C, Vera S, Bernabeu C, Massagué J, et al. Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells. J Biol Chem. 1992 Sep 25;267(27):19027–30.

244. Nielsen JS, McNagny KM. Novel functions of the CD34 family. J Cell Sci. 2008 Nov 15;121(Pt 22):3683–92.

245. Caignard G, Leiva-Torres GA, Leney-Greene M, Charbonneau B, Dumaine A, Fodil-Cornu N, et al. Genome-wide mouse mutagenesis reveals CD45-mediated T cell function as critical in protective immunity to HSV-1. PLoS Pathog. 2013 Sep;9(9):e1003637.

246. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy. 2006;8(4):315–7.

247. Baddoo M, Hill K, Wilkinson R, Gaupp D, Hughes C, Kopen GC, et al. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from murine bone marrow by negative selection. Journal of cellular biochemistry. 2003;89(6):1235–49.

248. Tropel P, Noël D, Platet N, Legrand P, Benabid AL, Berger F. Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow. Experimental cell research. 2004;295(2):395–406.

249. Peister A, Mellad JA, Larson BL, Hall BM, Gibson LF, Prockop DJ. Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential. Blood. 2004;103(5):1662–8.

250. Lee TC, Lee TH, Huang YH, Chang NK, Lin YJ, Chien PWC, et al. Comparison of surface markers between human and rabbit mesenchymal stem cells. PLoS One. 2014;9(11):e111390.

251. Bakhtina A, Tohfafarosh M, Lichtler A, Arinzeh TL. Characterization and differentiation potential of rabbit mesenchymal stem cells for translational regenerative medicine. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal. 2014;50(3):251–60.

252. Liu ZJ, Zhuge Y, Velazquez OC. Trafficking and differentiation of mesenchymal stem cells. J Cell Biochem. 2009 Apr 15;106(6):984–91.

253. Sottile V, Jackson L, Jones D, Scotting P. Adult mesenchymal stem cells: Differentiation potential and therapeutic applications. J Postgrad Med. 2007;53(2):121.

254. Ma S, Xie N, Li W, Yuan B, Shi Y, Wang Y. Immunobiology of mesenchymal stem cells. Cell death and differentiation. 2014;21(2):216.

255. Le Blanc K, Ringdén O. Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation. Biology of Blood and Marrow Transplantation. 2005;11(5):321–34.

256. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells. European journal of immunology. 2006;36(10):2566–73.

257. Djouad F, Fritz V, Apparailly F, Louis-Plence P, Bony C, Sany J, et al. Reversal of the immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells by tumor necrosis factor α in collagen-induced arthritis. Arthritis & Rheumatism. 2005;52(5):1595–603.

258. Prasanna JS, Gopalakrishnan D, Shankar SR, Vasandan AB. Pro-Inflammatory Cytokines, IFNc and TNFa, Influence Immune Properties of Human Bone Marrow and Whartonb Jelly Mesenchymal Stem Cells Differentially. PLos One [Internet]. 2010 [cited 2019 Jul 10];5. Available from: http://www.plosone.org/article/info:doi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0009016

259. William TT, Pendleton JD, Beyer WM, Egalka MC, Guinan EC. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. Transplantation. 2003;75(3):389–97.

260. Krampera M, Cosmi L, Angeli R, Pasini A, Liotta F, Andreini A, et al. Role for interferon-γ in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. Stem cells. 2006;24(2):386–98.

261. Sheng H, Wang Y, Jin Y, Zhang Q, Zhang Y, Wang L, et al. A critical role of IFNγ in priming MSC-mediated suppression of T cell proliferation through up-regulation of B7-H1. Cell research. 2008;18(8):846.

262. Beyth S, Borovsky Z, Mevorach D, Liebergall M, Gazit Z, Aslan H, et al. Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. Blood. 2005;105(5):2214–9.

263. Jiang XX, Zhang YI, Liu B, Zhang SX, Wu Y, Yu XD, et al. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. Blood. 2005;105(10):4120–6.

264. Spaggiari GM, Capobianco A, Abdelrazik H, Becchetti F, Mingari MC, Moretta L. Mesenchymal stem cells inhibit natural killer–cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2, 3-dioxygenase and prostaglandin E2. Blood. 2008;111(3):1327–33.

265. Zhang B, Liu R, Shi D, Liu X, Chen Y, Dou X, et al. Mesenchymal stem cells induce mature dendritic cells into a novel Jagged-2–dependent regulatory dendritic cell population. Blood. 2009;113(1):46–57.

266. Miranda Rodríguez A, Galván Cabrera JA, de León Delgado J. Propiedades inmunomoduladoras de las células madre mesenquimales. Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia. 2015 Mar;31(1):20–31.

267. Li H, Guo Z, Jiang X, Zhu H, Li X, Mao N. Mesenchymal stem cells alter migratory property of T and dendritic cells to delay the development of murine lethal acute graft-versus-host disease. Stem Cells. 2008;26(10):2531–41.

268. Rafei M, Hsieh J, Fortier S, Li M, Yuan S, Birman E, et al. Mesenchymal stromal cell–derived CCL2 suppresses plasma cell immunoglobulin production via STAT3 inactivation and PAX5 induction. Blood. 2008;112(13):4991–8.

269. Asari S, Itakura S, Ferreri K, Liu CP, Kuroda Y, Kandeel F, et al. Mesenchymal stem cells suppress B-cell terminal differentiation. Experimental hematology. 2009;37(5):604–15.

270. Angoulvant D, Clerc A, Benchalal S, Galambrun C, Farre A, Bertrand Y, et al. Human mesenchymal stem cells suppress induction of cytotoxic response to alloantigens. Biorheology. 2004;41(3-4):469–76.

271. Xu G, Zhang Y, Zhang L, Roberts AI, Shi Y. C/EBPβ mediates synergistic upregulation of gene expression by interferon-γ and tumor necrosis factor-α in bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Stem cells. 2009;27(4):942–8.

272. Mareschi K, Castiglia S, Sanavio F, Rustichelli D, Muraro M, Defedele D, et al. Immunoregulatory effects on T lymphocytes by human mesenchymal stromal cells isolated from bone marrow, amniotic fluid, and placenta. Experimental Hematology. 2016 Feb 1;44(2):138-150.e1.

273. Cho PS, Messina DJ, Hirsh EL, Chi N, Goldman SN, Lo DP, et al. Immunogenicity of umbilical cord tissue derived cells. Blood. 2008 Jan 1;111(1):430–8.

274. Kou M, Huang L, Yang J, Chiang Z, Chen S, Liu J, et al. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles for immunomodulation and regeneration: a next generation therapeutic tool? Cell Death Dis. 2022 Jul 4;13(7):1–16.

275. Ren G, Zhang L, Zhao X, Xu G, Zhang Y, Roberts AI, et al. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. Cell Stem Cell. 2008 Feb 7;2(2):141–50.

276. Fuentes Julián S. Estudio de la utilidad y mecanismos de acción de las células madre adultas del tejido adiposo para el tratamiento del rechazo tras trasplante corneal alogénico. 2015;

277. Information NC for B, Pike USNL of M 8600 R, MD B, Usa 20894. European Glaucoma Society Terminology and Guidelines for Glaucoma, 4th Edition - Chapter 2: Classification and terminologySupported by the EGS Foundation: Part 1: Foreword; Introduction; Glossary; Chapter 2 Classification and Terminology. The British Journal of Ophthalmology. 2017 May;101(5):73.

278. Chamling X, Sluch VM, Zack DJ. The Potential of Human Stem Cells for the Study and Treatment of Glaucoma. Investigative Opthalmology & Visual Science. 2016 Apr 26;57(5):ORSFi1.

279. Yamana T, Kita M, Ozaki S, Negi A, Honda Y. The process of closure of experimental retinal holes in rabbit eyes. Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology. 2000;238(1):81–7.

280. Xuqian W, Kanghua L, WeiHong Y, Xi Y, Rongping D, Qin H, et al. Intraocular Transplantation of Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells in a Rabbit Model of Experimental Retinal Holes. ORE. 2011;46(4):199–207.

281. Gower NJD, Barry RJ, Edmunds MR, Titcomb LC, Denniston AK. Drug discovery in ophthalmology: past success, present challenges, and future opportunities. BMC Ophthalmology [Internet]. 2016 Dec [cited 2018 Jan 17];16(1). Available from: http://bmcophthalmol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12886-016-0188-2

282. Nayoun K, Seok-Goo C. Overcoming immunoregulatory plasticity of mesenchymal stem cells for accelerated clinical applications. International journal of hematology [Internet]. 2016 Feb [cited 2024 Mar 11];103(2). Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26662288/

283. Sudres M, Norol F, Trenado A, Grégoire S, Charlotte F, Levacher B, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro but fail to prevent graft-versus-host disease in mice. The Journal of Immunology. 2006;176(12):7761–7.

284. Chan JL, Tang KC, Patel AP, Bonilla LM, Pierobon N, Ponzio NM, et al. Antigen-presenting property of mesenchymal stem cells occurs during a narrow window at low levels of interferon-γ. Blood. 2006;107(12):4817–24.

285. Kicic A, Shen WY, Wilson AS, Constable IJ, Robertson T, Rakoczy PE. Differentiation of marrow stromal cells into photoreceptors in the rat eye. Journal of Neuroscience. 2003;23(21):7742–9.

286. Inoue Y, Iriyama A, Ueno S, Takahashi H, Kondo M, Tamaki Y, et al. Subretinal transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells delays retinal degeneration in the RCS rat model of retinal degeneration. Experimental eye research. 2007;85(2):234–41.

287. Schäffler A, Büchler C. Concise review: adipose tissue-derived stromal cells—basic and clinical implications for novel cell-based therapies. Stem cells. 2007;25(4):818–27.

288. Puissant B, Barreau C, Bourin P, Clavel C, Corre J, Bousquet C, et al. Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. British Journal of Haematology. 2005;129(1):118–29.

289. Grinnemo KH, Månsson A, Dellgren G, Klingberg D, Wardell E, Drvota V, et al. Xenoreactivity and engraftment of human mesenchymal stem cells transplanted into infarcted rat myocardium. The Journal of thoracic and cardiovascular surgery. 2004;127(5):1293–300.

290. Arnberg F, Lundberg J, Olsson A, Samén E, Jaff N, Jussing E, et al. Intra-arterial Administration of Placenta-Derived Decidual Stromal Cells to the Superior Mesenteric Artery in the Rabbit: Distribution of Cells, Feasibility, and Safety. Cell Transplant. 2016;25(2):401–10.

291. Johnson TV, Bull ND, Hunt DP, Marina N, Tomarev SI, Martin KR. Neuroprotective Effects of Intravitreal Mesenchymal Stem Cell Transplantation in Experimental Glaucoma. Investigative Opthalmology & Visual Science. 2010 Apr 1;51(4):2051.

292. Joe AW, Gregory-Evans K. Mesenchymal Stem Cells and Potential Applications in Treating Ocular Disease. Current Eye Research. 2010;35(11):941–52.

293. SurveyMonkey [Internet]. [cited 2019 Mar 5]. Sample Size Calculator: Understanding Sample Sizes. Available from: https://www.surveymonkey.com/mp/sample-size-calculator/

294. Fiore T, Iaccher B, Pietrolucc F, Giansanti F, Cavaliere A, Coltella R. Retinal Toxicity of Intravitreal Genistein in a Rabbit Model: Retina. Retina. 2010;30(9):1536–41.

295. Melena J, Santafé J, Segarra J. The Effect of Topical Diltiazem on the Intraocular Pressure in Betamethasone-Induced Ocular Hypertensive Rabbits. 1998;284:5.

296. Fuentes Paredes F, Mendoza Yanavilca RA, Rivera Rodríguez R, Vara Márquez MD. Guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio: conejos. 2010;

297. Gelatt KN, Gelatt JP. Veterinary ophthalmic surgery. Elsevier Health Sciences; 2011.

298. Cruz-Barrera ML, Camacho B, Salguero GA. Células estromales mesenquimales de gelatina de Wharton inducen re-programación de macrófagos inflamatorios hacia un fenotipo inmunomodulador. Medicine. 2018;40(1):161.

299. Langevin N, Schafer k, Turner O, McPherson B, Rose R. Historical Data: Histopathology Lesions Observed in the Eyes of Control Rabbits in Topical Ocular Administration and Contact Lens Studies. Toxicologic Pathology. 2018;46(7):799–820.

300. Zimmerman A, Boyd R, Yekkala k. Correlations Between Retinal Optical Coherence Tomography and Histopathology in Preclinical Safety Assessment of Ocular Therapies. Toxicologic pathology [Internet]. 2021 Apr [cited 2023 Jun 14];49(3). Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33568004/

301. Gibson-Corley KN, Olivier AK, Meyerholz DK. Principles for valid histopathologic scoring in research. Vet Pathol. 2013 Nov;50(6):10.1177/0300985813485099.

302. García Luna Martínez JEE, Martínez Ibarra AA, Romo Arpio CA, Flores Elizondo LE, González Lugo JD, Díazceballos García AL, et al. El impacto socioeconómico del glaucoma primario de ángulo abierto en México. Revista Mexicana de Oftalmología. 2016 Sep;90(5):215–22.

303. Allison K, Patel D, Alabi O. Epidemiology of Glaucoma: The Past, Present, and Predictions for the Future. Cureus. 12(11):e11686.

304. Duggal P, Klein AP, Lee KE, Iyengar SK, Klein R, Bailey-Wilson JE, et al. A Genetic Contribution to Intraocular Pressure: The Beaver Dam Eye Study. Investigative Opthalmology & Visual Science. 2005 Feb 1;46(2):555.

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

306. Burr JM, Mowatt G, Hernández R, Siddiqui MA, Cook J, Lourenco T, et al. The clinical effectiveness and cost-effectiveness of screening for open angle glaucoma: a systematic review and economic evaluation. Health technology assessment (Winchester, England). 2007;11(41):1–190.

307. Aguirre M, Barría N, Henríquez E, Valenzuela G. Evaluación de resultados tensionales y visuales post cirugía filtrante en distintos tipos de glaucoma. [cited 2017 Oct 4]; Available from: http://www.medicinayhumanidades.cl/ediciones/n2017/especial_oftalmologia/03_%20CIRUGIA%20FILTRANTE%20EN%20DISTINTOS%20GLAUCOMAS.pdf

308. Uccelli A, Benvenuto F, Laroni A, Giunti D. Neuroprotective features of mesenchymal stem cells. Best Practice & Research Clinical Haematology. 2011 Mar;24(1):59–64.

309. Mrahleh MA, Matar S, Jafar H, Wehaibi S, Aslam N, Awidi A. Human Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stromal Cells Primed by Tumor Necrosis Factor-α and Interferon-γ Modulate the Innate and Adaptive Immune Cells of Type 1 Diabetic Patients. Front Immunol. 2021 Sep 28;12:732549.

310. Je MR, Fm NN, D GB, P SC, M B, Jm M, et al. Human Wharton's jelly mesenchymal stem cells protect axotomized rat retinal ganglion cells via secretion of anti-inflammatory and neurotrophic factors. Scientific reports [Internet]. 2018 Feb 11 [cited 2022 May 10];8(1). Available from: http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30389962/

311. Li G, Luna C, Liton PB, Navarro I, Epstein DL, Gonzalez P. Sustained stress response after oxidative stress in trabecular meshwork cells. Mol Vis. 2007 Dec 17;13:2282–8.

312. Nickells RW. From ocular hypertension to ganglion cell death: a theoretical sequence of events leading to glaucoma. Canadian Journal of Ophthalmology. 2007 Apr;42(2):278–87.

313. Huang P, Qi Y, Xu YS, Liu J, Liao D, Zhang SSM, et al. Serum cytokine alteration is associated with optic neuropathy in human primary open angle glaucoma. Journal of glaucoma. 2010;19(5):324–30.

314. English K, Barry FP, Field-Corbett CP, Mahon BP. IFN-gamma and TNF-alpha differentially regulate immunomodulation by murine mesenchymal stem cells. Immunol Lett. 2007 Jun 15;110(2):91–100.

315. Bollinger K, Kim J, Lowder CY, Kaiser PK, Smith SD. Intraocular pressure outcome of patients with fluocinolone acetonide intravitreal implant for noninfectious uveitis. Ophthalmology. 2011 Oct;118(10):1927–31.

316. Clark AF, Wordinger RJ. The role of steroids in outflow resistance. Experimental Eye Research. 2009 Apr 30;88(4):752–9.

317. A. Bouhenni R, Dunmire J, Sewell A, Edward DP. Animal Models of Glaucoma. J Biomed Biotechnol [Internet]. 2012 [cited 2019 Jul 19];2012. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3364028/

318. Fini ME, Schwartz SG, Gao X, Jeong S, Patel N, Itakura T, et al. Steroid-induced ocular hypertension/glaucoma: Focus on pharmacogenomics and implications for precision medicine. Progress in Retinal and Eye Research. 2017 Jan;56:58–83.

319. Brattsand R, Linden M. Cytokine modulation by glucocorticoids: mechanisms and actions in cellular studies. Alimentary Pharmacology & Therapeutics. 1996;10(Sup2):81–90.

320. Yagi-Yaguchi Y, Yamaguchi T, Higa K, Suzuki T, Yazu H, Aketa N, et al. Preoperative Aqueous Cytokine Levels Are Associated With a Rapid Reduction in Endothelial Cells After Penetrating Keratoplasty. American Journal of Ophthalmology. 2017 Sep 1;181:166–73.

321. Yamaguchi T, Higa K, Suzuki T, Nakayama N, Yagi-Yaguchi Y, Dogru M, et al. Elevated Cytokine Levels in the Aqueous Humor of Eyes With Bullous Keratopathy and Low Endothelial Cell Density. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2016 Nov 1;57(14):5954–62.

322. Cutolo M, Seriolo B, Pizzorni C, Secchi ME, Soldano S, Paolino S, et al. Use of glucocorticoids and risk of infections. Autoimmunity reviews [Internet]. 2008 Dec [cited 2024 Mar 12];8(2). Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18703175/

323. Sánchez-Berná I, Santiago-Díaz C, Jiménez-Alonso J. Acción inmunomoduladora de las células madre mesenquimales en las enfermedades autoinmunitarias. Medicina Clínica. 2015 Jan;144(2):88–91.

324. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. Nat Rev Immunol. 2008 Sep;8(9):726–36.

325. Joerger-Messerli MS, Marx C, Oppliger B, Mueller M, Surbek DV, Schoeberlein A. Mesenchymal Stem Cells from Wharton's Jelly and Amniotic Fluid. Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology. 2016 Feb 1;31:30–44.

326. Evangelho K, Mastronardi CA, de-la-Torre A. Experimental Models of Glaucoma: A Powerful Translational Tool for the Future Development of New Therapies for Glaucoma in Humans-A Review of the Literature. Medicina (Kaunas). 2019 Jun 17;55(6).

327. Roberti G, Oddone F, Agnifili L, Katsanos A, Michelessi M, Mastropasqua L, et al. Steroid-induced glaucoma: Epidemiology, pathophysiology, and clinical management. Survey of Ophthalmology. 2020 Jul;65(4):458–72.

328. Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM, Egalka MC, Guinan EC. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: Implications in transplantation. Trasplante. 2003 Feb 15;

329. Skaggs H, Chellman Gj, Collinge M, Enright B, Fuller Cl, Krayer J, et al. Comparison of Immune System Development in Nonclinical Species and Humans: Closing Information Gaps for Immunotoxicity Testing and Human Translatability. Reproductive Toxicology. 2019 Jun;S0890623818306609.

330. Moore M a. S, Williams N. Analysis of Proliferation and Differentiation of Foetal Granulocyte-Macrophage Progenitor Cells in Haemopoietic Tissue*. Cell Proliferation. 1973;6(5):461–76.

331. Jasper PJ, Zhai SK, Kalis SL, Kingzette M, Knight KL. B Lymphocyte Development in Rabbit: Progenitor B Cells and Waning of B Lymphopoiesis. The Journal of Immunology. 2003;171(12):6372–80.

332. Fujiwara S, Armstrong RM, Cinader B. Age and organ dependent variations in the number of thymus derived RTLA bearing cells. Immunological communications. 1974;3(3):275–84.

333. Sabin FR, Miller FR, Smithburn KC, Thomas RM, Hummel LE. Changes in the bone marrow and blood cells of developing rabbits. J Exp Med. 1936 Jun 30;64(1):97–120.

334. Archer OK, Papermaster BW, Good RA. Thymectomy in rabbit and mouse: consideration of time of lymphoid peripheralization. The Thymus in Immunobiology. 1964;414–35.

335. Wang J, Lei C, Tao L, Wu Q, Ke X, Qiu Y, et al. A safety study of high concentration and high frequency intravitreal injection of conbercept in rabbits. Sci Rep [Internet]. 2017 Apr 4 [cited 2019 Jul 19];7. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5428866/

336. Er H, Doganay S, Turkoz Y, Cekmen M, Daglioglu MC, Gunduz A, et al. The Levels of Cytokines and Nitric Oxide in Rabbit Vitreous Humor after Retinal Laser Photocoagulation. Ophthalmic Surg Lasers Imaging Retina. 2000 Nov 1;31(6):479–83.

337. Mo JS, Matsukawa A, Ohkawara S, Yoshinaga M. Involvement of TNF α, IL-1β and IL-1 Receptor Antagonist in LPS-induced Rabbit Uveitis. Experimental Eye Research. 1998 May 1;66(5):547–57.

338. Bilgihan K, Gürelik G, Okur H, Bilgihan A, Hasanreisoğlu B, Imir T. Aqueous Transforming Growth Factor-Beta-I Levels in Rabbit Eyes after Excimer Laser Photoablation. OPH. 1997;211(6):380–3.

339. Hostetler JR, Ackerman GA. Lymphopoiesis and lymph node histogenesis in the embryonic and neonatal rabbit. American Journal of Anatomy. 1969;124(1):57–75.

340. Simpson A, Horton MA. Expression of the vitronectin receptor during embryonic development; an immunohistological study of the ontogeny of the osteoclast in the rabbit. Br J Exp Pathol. 1989;70(3):257–65.

341. Pospisil R, Mage RG. Rabbit appendix: a site of development and selection of the B cell repertoire. In: Somatic Diversification of Immune Responses. Springer; 1998. p. 59–70.

342. Cooper MD, Perey DY, Gabrielsen AE, Sutherland DER, McKneally MF, Good RA. Production of an antibody deficiency syndrome in rabbits by neonatal removal of organized intestinal lymphoid tissues. International Archives of Allergy and Immunology. 1968;33(1):65–88.

343. Vecino E. Modelos animales en el estudio del glaucoma: pasado, presente y futuro. Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología. 2008;83(9):517–9.

344. Vidal-Sanz M, Salinas-Navarro M, Nadal-Nicolás FM, Alarcón-Martínez L, Valiente-Soriano FJ, Miralles de Imperial J, et al. Understanding glaucomatous damage: Anatomical and functional data from ocular hypertensive rodent retinas. Progress in Retinal and Eye Research. 2012 Jan;31(1):1–27.

345. Weinreb RN, Lindsey JD. The importance of models in glaucoma research. Journal of glaucoma. 2005;14(4):302–4.

346. Peiffer RL, Armstrong JR, Johnson PT. Animals in Ophthalmic Research: Concepts and Methodologies. In: Methods of Animal Experimentation [Internet]. Elsevier; 1981 [cited 2019 Mar 14]. p. 139–235. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780122780066500082

347. Fernandes KA, Harder JM, Williams PA, Rausch RL, Kiernan AE, Nair KS, et al. Using Genetic Mouse Models to Gain Insight into Glaucoma: Past Results and Future Possibilities. Exp Eye Res. 2015 Dec;141:42–56.

348. Chen L, Zhao Y, Zhang H. Comparative Anatomy of the Trabecular Meshwork, the Optic Nerve Head and the Inner Retina in Rodent and Primate Models Used for Glaucoma Research. Vision. 2016 Jul 18;1(1):4.

349. Vecino E, Sharma SC. Glaucoma animal models. In: Glaucoma-Basic and Clinical Concepts [Internet]. InTech; 2011 [cited 2017 Oct 3]. Available from: https://www.intechopen.com/download/pdf/23828

350. Borghi V, Bastia E, Guzzetta M, Chiroli V, Toris CB, Batugo MR, et al. A Novel Nitric Oxide Releasing Prostaglandin Analog, NCX 125, Reduces Intraocular Pressure in Rabbit, Dog, and Primate Models of Glaucoma. Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics. 2010 Apr 1;26(2):125–32.

351. Ollivier FJ, Brooks DE, Kallberg ME, Sapp HL, Komáromy AM, Stevens GR, et al. Time-specific intraocular pressure curves in Rhesus macaques (Macaca mulatta) with laser-induced ocular hypertension. Veterinary Ophthalmology. 2004 Mar 1;7(1):23–7.

352. Johnson TV, Tomarev SI. Rodent models of glaucoma. Brain Research Bulletin. 2010 Feb;81(2–3):349–58.

353. Vecino E. Modelos animales en el estudio del glaucoma: pasado, presente y futuro. Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología. 2008;83(9):517–9.

354. Ortín Martínez A. Análisis de la degeneración de los fotorreceptoes en modelos experimentales de retinosis pigmentaria, degeneración macular asociada a la edad y glaucoma= Analysis of photoreceptor degeneration in experimental models of retinitis pigmentosa, aging macular degeneration and glaucoma. Universidad de Murcia; 2015.

355. Perlman I. Testing retinal toxicity of drugs in animal models using electrophysiological and morphological techniques. Doc Ophthalmol. 2009 Feb 1;118(1):3.

356. Edward DP, Bouhenni R. Anterior segment alterations and comparative aqueous humor proteomics in the buphthalmic rabbit (an American Ophthalmological Society thesis). Trans Am Ophthalmol Soc. 2011;109:66–114.

357. Bill A, Stjernschantz J. Cholinergic vasoconstrictor effects in the rabbit eye: Vasomotor effects of pentobarbital anesthesia. Acta Physiologica Scandinavica. 1980 Apr 1;108(4):419–24.

358. Werner L, Chew J, Mamalis N. Experimental evaluation of ophthalmic devices and solutions using rabbit models. Veterinary Ophthalmology. 2006;9(5):281–91.

359. Chaudhary V, Hansen R, Lindgren H, Fulton A. Effects of telazol and nembutal on retinal responses. Documenta Ophthalmologica. 2003 Jul 1;107(1):45–51.

360. Tremblay F, Parkinson JE. Alteration of electroretinographic recordings when performed under sedation or halogenate anesthesia in a pediatric population. Documenta Ophthalmologica. 2003 Nov 1;107(3):271–9.

361. Gjörloff K, Andréasson S, Ehinger B. Standardized full-field electroretinography in rabbits. Documenta Ophthalmologica. 2004 Sep 1;109(2):163–8.

362. Mizota A, Adachi-Usami E. Effect of body temperature on electroretinogram of mice. Investigative ophthalmology & visual science. 2002;43(12):3754–7.

363. Lachapelle P, Benoit, J, Guité P. The effect of in vivo retinal cooling on the electroretinogram of the rabbit. Vision research. 1996;36(3):339–44.

364. Hanna BL, Sawin PB, Sheppard LB. Recessive Buphthalmos in the Rabbit. Genetics. 1962 May 1;47(5):519–29.

365. Rukmini AV, Milea D, Gooley JJ. Chromatic Pupillometry Methods for Assessing Photoreceptor Health in Retinal and Optic Nerve Diseases. Frontiers in Neurology [Internet]. 2019 Feb 12 [cited 2019 Mar 29];10. Available from: https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fneur.2019.00076/full

366. Rukmini AV, Milea D, Baskaran M, How AC, Perera SA, Aung T, et al. Pupillary Responses to High-Irradiance Blue Light Correlate with Glaucoma Severity. Ophthalmology. 2015 Sep;122(9):1777–85.

367. Grozdanic SD, Matic M, Sakaguchi DS, Kardon RH. Evaluation of Retinal Status Using Chromatic Pupil Light Reflex Activity in Healthy and Diseased Canine Eyes. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2007 Nov 1;48(11):5178–83.

368. Melena J, Santafé J, Segarra J. The Effect of Topical Diltiazem on the Intraocular Pressure in Betamethasone-Induced Ocular Hypertensive Rabbits. J Pharmacol Exp Ther. 1998 Jan 1;284(1):278–82.

369. Phulke S, Kaushik S, Kaur S, Pandav S. Steroid-induced Glaucoma: An Avoidable Irreversible Blindness. Journal of Current Glaucoma Practice. 2017;11(2):67–72.

370. Moore CG, Milne ST, Morrison JC. Noninvasive measurement of rat intraocular pressure with the Tono-Pen. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1993 Feb 1;34(2):363–9.

371. Moore CG, Johnson EC, Morrison JC. Circadian rhythm of intraocular pressure in the rat. Current Eye Research. 1996 Feb;15(2):185–91.

372. Jia L, Cepurna WO, Johnson EC, Morrison JC. Effect of general anesthetics on IOP in rats with experimental aqueous outflow obstruction. Investigative Ophthalmology and Visual Science. 2000;41(11):3415–9.

373. Haleem MS, Han L, van Hemert J, Li B. Automatic extraction of retinal features from colour retinal images for glaucoma diagnosis: A review. Computerized Medical Imaging and Graphics. 2013 Oct 1;37(7):581–96.

374. Nomura T, Honmou O, Harada K, Houkin K, Hamada H, Kocsis JD. I.v. infusion of brain-derived neurotrophic factor gene-modified human mesenchymal stem cells protects against injury in a cerebral ischemia model in adult rat. Neuroscience. 2005 Jan 1;136(1):161–9.

375. Lai RC, Arslan F, Lee MM, Sze NSK, Choo A, Chen TS, et al. Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. Stem Cell Research. 2010 May 1;4(3):214–22.

376. Tuekprakhon A, Sangkitporn S, Trinavarat A, Pawestri AR, Vamvanij V, Ruangchainikom M, et al. Intravitreal autologous mesenchymal stem cell transplantation: a non-randomized phase I clinical trial in patients with retinitis pigmentosa. Stem Cell Research & Therapy. 2021 Jan 9;12(1):52.

377. Vilela CAP, Messias A, Calado RT, Siqueira RC, Silva MJL, Covas DT, et al. Retinal function after intravitreal injection of autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in advanced glaucoma. Doc Ophthalmol. 2021 Aug;143(1):33–8.

378. Satarian L, Nourinia R, Safi S, Kanavi M, Jarughi N, Daftarian N, et al. Intravitreal injection of bone marrow mesenchymal stem cells in patients with advanced retinitis pigmentosa; a safety study. J Ophthalmic Vis Res. 2017;12(1):58.

379. Johnson TV, Bull ND, Martin KR. Identification of Barriers to Retinal Engraftment of Transplanted Stem Cells. Investigative Ophthalmology & Visual Science. 2010 Feb 1;51(2):960–70.

380. Chacko DM, Das AV, Zhao X, James J, Bhattacharya S, Ahmad I. Transplantation of ocular stem cells: the role of injury in incorporation and differentiation of grafted cells in the retina. Vision Research. 2003 Apr 1;43(8):937–46.

381. Johnson TV, Bull ND, Martin KR. Transplantation prospects for the inner retina. Eye. 2009 Oct;23(10):1980–4.

382. Park JH, Choi YJ, Kang SY, Ju H, Min KW, Kim NY, et al. Organ-Specific Differentiation of Human Adipose-Derived Stem Cells in Various Organs of Xenotransplanted Rats: A Pilot Study. Life. 2022 Aug;12(8):1116.

383. Cargnoni A, Gibelli L, Tosini A, Signoroni PB, Nassuato C, Arienti D, et al. Transplantation of Allogeneic and Xenogeneic Placenta-Derived Cells Reduces Bleomycin-Induced Lung Fibrosis. Cell Transplantation [Internet]. 2009 Apr 1 [cited 2023 Jun 14]; Available from: https://journals.sagepub.com/doi/10.3727/096368909788809857?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub++0pubmed

384. Hui B, Yao-Dong F a. N, Li-Yun GUO, Hua-Lin YU. A technique of rhesus monkey neural progenitor cells intravitreal transplant to rats. zr. 2012 Feb 22;33(1):85–8.

385. Stanzel BV, Liu Z, Somboonthanakij S, Wongsawad W, Brinken R, Eter N, et al. Human RPE Stem Cells Grown into Polarized RPE Monolayers on a Polyester Matrix Are Maintained after Grafting into Rabbit Subretinal Space. Stem Cell Reports. 2014 Jan;2(1):64–77.

386. Bull ND, Limb GA, Martin KR. Human Müller Stem Cell (MIO-M1) Transplantation in a Rat Model of Glaucoma: Survival, Differentiation, and Integration. Investigative Ophthalmology & Visual Science. 2008 Aug 1;49(8):3449–56.

387. Park HYL, Jung SH, Park SH, Park CK. Detecting autonomic dysfunction in patients with glaucoma using dynamic pupillometry. Medicine (Baltimore) [Internet]. 2019 Mar 15 [cited 2021 May 12];98(11). Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6426567/

388. Weinreb RN, Khaw PT. Primary open-angle glaucoma. The Lancet. 2004 May 22;363(9422):1711–20.

389. McDougal DH, Gamlin PD. The influence of intrinsically-photosensitive retinal ganglion cells on the spectral sensitivity and response dynamics of the human pupillary light reflex. Vision Res. 2010 Jan;50(1):72–87.

390. Marg E, Morgan MW. The pupillary near reflex; the relation of pupillary diameter to accommodation and the various components of convergence. Am J Optom Arch Am Acad Optom. 1949 May;26(5):183–98.

391. Najjar RP, Sharma S, Atalay E, Rukmini AV, Sun C, Lock JZ, et al. Pupillary Responses to Full-Field Chromatic Stimuli Are Reduced in Patients with Early-Stage Primary Open-Angle Glaucoma. Ophthalmology. 2018 Sep;125(9):1362–71.

392. De Monasterio FM. Spectral interactions in horizontal and ganglion cells of the isolated and arterially-perfused rabbit retina. Brain Research. 1978 Jul;150(2):239–58.

393. Soukup P, Maloca P, Altmann B, Festag M, Atzpodien EA, Pot S. Interspecies Variation of Outer Retina and Choriocapillaris Imaged With Optical Coherence Tomography. Investigative Ophthalmology & Visual Science. 2019 Aug 1;60(10):3332–42.

394. Tzameret A, Kalish SE, Sher I, Twito L, Meir A, Levy I, et al. Long-Term Safety of Transplanting Human Bone Marrow Stromal Cells into the Extravascular Spaces of the Choroid of Rabbits. Stem Cells International. 2017;2017:1–13.

395. Adhikari P, Zele AJ, Thomas R, Feigl B. Quadrant Field Pupillometry Detects Melanopsin Dysfunction in Glaucoma Suspects and Early Glaucoma. Sci Rep. 2016 Sep 13;6:33373.

396. Lin B, Koizumi A, Tanaka N, Panda S, Masland RH. Restoration of visual function in retinal degeneration mice by ectopic expression of melanopsin. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Oct 14;105(41):16009–14.

397. Tai TYT. Visual Evoked Potentials and Glaucoma. The Asia-Pacific Journal of Ophthalmology. 2018 Oct;7(5):352–5.

398. Mead B, Logan A, Berry M, Leadbeater W, Scheven BA. Intravitreally transplanted dental pulp stem cells promote neuroprotection and axon regeneration of retinal ganglion cells after optic nerve injury. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2013 Nov 15;54(12):7544–56.

399. Ezquer M, Urzua CA, Montecino S, Leal K, Conget P, Ezquer F. Intravitreal administration of multipotent mesenchymal stromal cells triggers a cytoprotective microenvironment in the retina of diabetic mice. Stem Cell Res Ther. 2016 Dec;7(1):42.

400. Firan AM, Istrate S, Iancu R, Tudosescu R, Ciuluvică R, Voinea L. Visual evoked potential in the early diagnosis of glaucoma. Literature review. Rom J Ophthalmol. 2020;64(1):15–20.

401. Lee EJ, Kim TW, Weinreb RN, Park KH, Kim SH, Kim DM. Visualization of the lamina cribrosa using enhanced depth imaging spectral-domain optical coherence tomography. Am J Ophthalmol. 2011 Jul;152(1):87-95.e1.

402. Fatehee N, Yu P, Morgan W, Cringle S, Yu DY. Correlating morphometric parameters of the porcine optic nerve head in spectral domain optical coherence tomography with histological sections. British Journal of Opthalmology. 2011;95:585–9.

403. Kagemann L, Ishikawa H, Wollstein G, Brennen PM, Townsend KA, Gabriele ML, et al. Ultrahigh-resolution spectral domain optical coherence tomography imaging of the lamina cribrosa. Ophthalmic Surg Lasers Imaging. 2008;39(4 Suppl):S126-131.

404. Moore DB, Jaffe GJ, Asrani S. Retinal Nerve Fiber Layer Thickness Measurements: Uveitis, A Major Confounding Factor. Ophthalmology. 2015 Mar;122(3):511–7.

405. Taylor AW. Ocular immune privilege. Eye [Internet]. 2009 Oct [cited 2019 Jun 12];23(10):1885–9. Available from: http://www.nature.com/articles/eye2008382

406. Trible JR, Sergott RC, Spaeth GL, Wilson RP, Katz LJ, Moster MR, et al. Trabeculectomy is associated with retrobulbar hemodynamic changes. A color Doppler analysis. Ophthalmology. 1994 Feb;101(2):340–51.

407. Parrish RK, Feuer WJ, Schiffman JC, Lichter PR, Musch DC. Five-year follow-up optic disc findings of the Collaborative Initial Glaucoma Treatment Study. Am J Ophthalmol. 2009 Apr;147(4):717-724.e1.

408. Lesk MR, Spaeth GL, Azuara-Blanco A, Araujo SV, Katz LJ, Terebuh AK, et al. Reversal of optic disc cupping after glaucoma surgery analyzed with a scanning laser tomograph. Ophthalmology. 1999 May;106(5):1013–8.

409. Mead B, Tomarev S. Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells-Derived Exosomes Promote Survival of Retinal Ganglion Cells Through miRNA-Dependent Mechanisms. Stem Cells Transl Med. 2017 Apr;6(4):1273–85.

410. Drela K, Lech W, Figiel-Dabrowska A, Zychowicz M, Mikula M, Sarnowska A, et al. Enhanced neuro-therapeutic potential of Wharton's Jelly–derived mesenchymal stem cells in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells culture. Cytotherapy. 2016 Apr;18(4):497–509.

411. Yang CC, Shih YH, Ko MH, Hsu SY, Cheng H, Fu YS. Transplantation of Human Umbilical Mesenchymal Stem Cells from Wharton's Jelly after Complete Transection of the Rat Spinal Cord. PLOS ONE. 2008 Oct 6;3(10):e3336.

412. Park HYL, Shin HY, Jung KI, Park CK. Changes in the lamina and prelamina after intraocular pressure reduction in patients with primary open-angle glaucoma and acute primary angle-closure. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2014 Jan 9;55(1):233–9.

413. Dubielzig RR, Ketring K, McLellan GJ, Albert DM. Veterinary ocular pathology: A comparative review. Elsevier Urgencias -; 2010.

414. Scott EM, Boursiquot N, Beltran WA, Dubielzig RR. Early histopathologic changes in the retina and optic nerve in canine primary angle-closure glaucoma. Veterinary Ophthalmology. 2013;16(s1):79–86.

415. Beamer G, Reilly CM, Pizzirani S. Microscopic Lesions in Canine Eyes with Primary Glaucoma. Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice. 2015 Nov 1;45(6):1213–33.

416. Frank D, Vince JE. Pyroptosis versus necroptosis: similarities, differences, and crosstalk. Cell Death Differ. 2019 Jan;26(1):99–114.

417. Zhang Q, Hu X min, Zhao W juan, Ban X xia, Li Y, Huang Y xia, et al. Targeting Necroptosis: A Novel Therapeutic Option for Retinal Degenerative Diseases. Int J Biol Sci. 2023 Jan 1;19(2):658–74.

418. He C, Liu Y, Huang Z, Yang Z, Zhou T, Liu S, et al. A specific RIP3+ subpopulation of microglia promotes retinopathy through a hypoxia-triggered necroptotic mechanism. Proc Natl Acad Sci U S A. 2021 Mar 16;118(11):e2023290118.

419. Froger N, Matonti F, Roubeix C, Forster V, Ivkovic I, Brunel N, et al. VEGF is an autocrine/paracrine neuroprotective factor for injured retinal ganglion neurons. Sci Rep. 2020 Jul 24;10(1):12409.

420. Dharmasaroja P. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells for the treatment of ischemic stroke. Journal of Clinical Neuroscience. 2009 Jan 1;16(1):12–20.

421. Usategui-Martín R, Puertas-Neyra K, Galindo-Cabello N, Hernández-Rodríguez LA, González-Pérez F, Rodríguez-Cabello JC, et al. Retinal Neuroprotective Effect of Mesenchymal Stem Cells Secretome Through Modulation of Oxidative Stress, Autophagy, and Programmed Cell Death. Investigative Ophthalmology & Visual Science. 2022 Apr 29;63(4):27.

422. Dempster AG, Molteno ACB, Bevin TH, Thompson AM. Otago glaucoma surgery outcome study: electron microscopy of capsules around Molteno implants. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2011 Oct 21;52(11):8300–9.

423. Bellezza AJ, Rintalan CJ, Thompson HW, Downs JC, Hart RT, Burgoyne CF. Deformation of the Lamina Cribrosa and Anterior Scleral Canal Wall in Early Experimental Glaucoma. Investigative Ophthalmology & Visual Science. 2003 Feb 1;44(2):623–37.

424. Yang H, Downs JC, Bellezza A, Thompson H, Burgoyne CF. 3-D histomorphometry of the normal and early glaucomatous monkey optic nerve head: prelaminar neural tissues and cupping. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2007 Nov;48(11):5068–84.

425. Wang L, Cioffi GA, Cull G, Dong J, Fortune B. Immunohistologic evidence for retinal glial cell changes in human glaucoma. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2002 Apr;43(4):1088–94.

426. Tezel G, Wax MB. Glaucoma. Chem Immunol Allergy. 2007;92:221–7.

427. Lorber B, Guidi A, Fawcett JW, Martin KR. Activated retinal glia mediated axon regeneration in experimental glaucoma. Neurobiol Dis. 2012 Jan;45(1):243–52.

428. Ramírez AI, Salazar JJ, de Hoz R, Rojas B, Gallego BI, Salinas-Navarro M, et al. Quantification of the effect of different levels of IOP in the astroglia of the rat retina ipsilateral and contralateral to experimental glaucoma. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2010 Nov;51(11):5690–6.

429. Van Horssen J, Singh S, van der Pol S, Kipp M, Lim JL, Peferoen L, et al. Clusters of activated microglia in normal-appearing white matter show signs of innate immune activation. J Neuroinflammation. 2012 Jul 2;9:156.

430. Li L, Eter N, Heiduschka P. The microglia in healthy and diseased retina. Experimental Eye Research. 2015 Jul 1;136:116–30.

431. Wang JW, Chen SD, Zhang XL, Jonas JB. Retinal Microglia in Glaucoma. Journal of Glaucoma. 2016 May;25(5):459.

432. Tezel G, Wax MB. The immune system and glaucoma: Current Opinion in Ophthalmology. 2004 Apr;15(2):80–4.

433. Serra HA, Roganovich JM, Rizzo LFL. Glucocorticoides: paradigma de medicina traslacional. De lo molecular al uso clínico. Medicina (Buenos Aires). 2012 Apr;72(2):158–70.

434. Liton PB, Luna C, Bodman M, Hong A, Epstein DL, Gonzalez P. Induction of IL-6 expression by mechanical stress in the trabecular meshwork. Biochem Biophys Res Commun. 2005 Dec 2;337(4):1229–36.

435. Newman RE, Yoo D, LeRoux MA, Danilkovitch-Miagkova A. Treatment of inflammatory diseases with mesenchymal stem cells. Inflamm Allergy Drug Targets. 2009 Jun;8(2):110–23.

436. Genini S, Beltran WA, Stein VM, Aguirre GD. Isolation and Ex Vivo Characterization of the Immunophenotype and Function of Microglia/Macrophage Populations in Normal Dog Retina. Adv Exp Med Biol. 2014;801:339–45.

437. Chen H, Cho KS, Vu THK, Shen CH, Kaur M, Chen G, et al. Commensal microflora-induced T cell responses mediate progressive neurodegeneration in glaucoma. Nat Commun. 2018 Aug 10;9(1):1–13.

438. Pantalon A, Obadă O, Constantinescu D, Feraru C, Chiseliţă D. Inflammatory model in patients with primary open angle glaucoma and diabetes. Int J Ophthalmol. 2019 May 18;12(5):795–801.

439. Yang Y, Abdulatef ASWA, Zhang L, Jiang H, Zeng Z, Li H, et al. Cross-talk between MYOC p. Y437H mutation and TGF-β2 in the pathology of glaucoma. Int J Med Sci. 2020;17(8):1062–70.

440. Dheen ST, Kaur C, Ling EA. Microglial activation and its implications in the brain diseases. Curr Med Chem. 2007;14(11):1189–97.

441. Djouad F, Charbonnier LM, Bouffi C, Louis-Plence P, Bony C, Apparailly F, et al. Mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of dendritic cells through an interleukin-6-dependent mechanism. Stem Cells. 2007 Aug;25(8):2025–32.

442. Yang X, Zeng Q, Göktaş E, Gopal K, Al-Aswad L, Blumberg DM, et al. T-Lymphocyte Subset Distribution and Activity in Patients With Glaucoma. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2019 Mar;60(4):877–88.

443. Meisel R, Zibert A, Laryea MD, Göbel U, Däubener W, Dilloo D. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. Blood. 2004 Jul 1;103:4619–21.

444. Baltmr A, Duggan J, Nizari S, Salt TE, Cordeiro MF. Neuroprotection in glaucoma – Is there a future role? Experimental Eye Research. 2010 Nov;91(5):554–66.

445. Hou Y, Ryu CH, Jun JA, Kim SM, Jeong CH, Jeun SS. IL-8 enhances the angiogenic potential of human bone marrow mesenchymal stem cells by increasing vascular endothelial growth factor. Cell Biol Int. 2014 Sep;38(9):1050–9.

446. Svobodova E, Krulova M, Zajicova A, Pokorna K, Prochazkova J, Trosan P, et al. The role of mouse mesenchymal stem cells in differentiation of naive T-cells into anti-inflammatory regulatory T-cell or proinflammatory helper T-cell 17 population. Stem Cells Dev. 2012 Apr 10;21(6):901–10.

447. Goshi N, Morgan RK, Lein PJ, Seker E. A primary neural cell culture model to study neuron, astrocyte, and microglia interactions in neuroinflammation. J Neuroinflammation. 2020 May 11;17(1):155.

448. Shao M, Xu Q, Wu Z, Chen Y, Shu Y, Cao X, et al. Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells ameliorate IL-6-induced acute liver injury through miR-455-3p. Stem Cell Res Ther. 2020 Jan 23;11:37.

449. Wang L, Wei X. T Cell-Mediated Autoimmunity in Glaucoma Neurodegeneration. Front Immunol. 2021 Dec 16;12:803485.

450. Kipnis J, Mizrahi T, Hauben E, Shaked I, Shevach E, Schwartz M. Neuroprotective autoimmunity: Naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells suppress the ability to withstand injury to the central nervous system. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2002 Nov 26;99(24):15620–5.

451. Luz-Crawford P, Kurte M, Bravo-Alegría J, Contreras R, Nova-Lamperti E, Tejedor G, et al. Mesenchymal stem cells generate a CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cell population during the differentiation process of Th1 and Th17 cells. Stem Cell Res Ther. 2013 Jun 4;4(3):65.

452. Cohan BE, Bohr DF. Goldmann Applanation Tonometry in the Conscious Rat. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2001 Feb 1;42(2):340–2.

453. Shinozaki Y, Koizumi S. Potential roles of astrocytes and Müller cells in the pathogenesis of glaucoma. J Pharmacol Sci. 2021 Mar;145(3):262–7.

ANEXOS

a) Carta aprobación Comité de Ética

Escuela Superior de Oftalmología
Instituto Barraquer de América

Bogotá D.C., febrero 26 de 2019

Doctoras
Alejandra De La Torre
Karine Evangelho

Asunto: Respuesta a solicitud de aprobación de procedimientos con animales.

Respetadas Doctoras,

El Comité de Ética en Investigación con Animales CEIA-ESO-IBA después de revisar los documentos entregados por usted, emite el concepto de APROBADO al desarrollo de los procedimientos con animales, del proyecto: "Efecto de la aplicación de las células madre mesenquimales en la respuesta inflamatoria específica, en el humor acuoso, en un modelo animal experimental de hipertensión ocular".

Quedamos atentos para despejar cualquier duda al respecto.

Cordial saludo,

Alejandra M. Muñoz Suárez
Presidente del CEIA-ESO-IBA

Página 1

C-20190226-1
Departamento de Investigación, Desarrollo e Innovación

➢ b) *RESULTADOS DEL ESTUDIO PILOTO*

En esta fase del estudio, se logró el objetivo de diseñar y estandarizar un modelo experimental de hipertensión ocular en conejos de la raza Nueva Zelanda. A continuación, se presentan las principales características observadas y los resultados obtenidos:

- ***Características generales observadas***

1. Los conejos demostraron ser un modelo experimental altamente útil en la investigación oftalmológica, ya que el tamaño de sus ojos no afectó los resultados del estudio y permitió una mejor visualización del segmento estudiado.
2. La ausencia de pigmento en la retina de la raza Nueva Zelanda facilitó la visualización de la retina, permitiendo un control más efectivo de los posibles efectos adversos durante la inducción de hipertensión ocular. Por lo tanto, se considera que esta raza es la más adecuada para el estudio.

- ***Estandarización del modelo de hipertensión ocular***

1. La técnica de aplicación subconjuntival y tópica de glucocorticoides resultó ser un método sencillo y eficaz para la inducción de hipertensión ocular (HO), siendo menos invasivo para los animales.
2. La inducción del modelo de HO no provocó cambios en el comportamiento de los animales relacionados con la clínica oftalmológica, ni se observaron alteraciones en la superficie ocular (ver figura 56). Además, los animales mantuvieron niveles normales de ingesta y actividad, sin necesidad de ser excluidos del estudio.

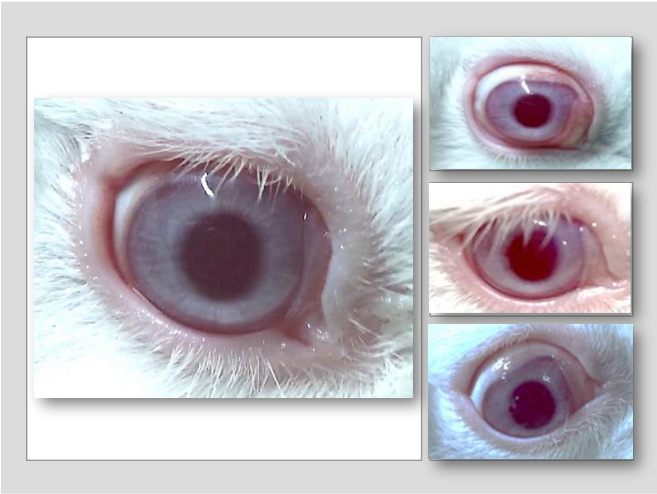


Figura 56: **Ojo experimental de los animales sometidos al estudio**. Sin anormalidades de superfície ocular en la semana 4 del experimento.

3. Durante el procedimiento de medición de la PIO, se observó que el parpadeo reflejo podría afectar los resultados al dificultar el contacto directo del aparato con la córnea. Para evitar esta complicación, se aplicó colirio anestésico (práctica que se mantendrá en la fase experimental) y se aseguró una buena contención de los animales. Además, se notó que, al sujetar al animal durante la toma de muestras, es importante evitar aplicar fuerza o presión en la cavidad orbitaria y yugular, ya que esto puede aumentar la PIO hasta 5 mmHg, lo que conduciría a resultados falsos positivos.
4. Se logró inducir un aumento en la PIO mediante la aplicación tópica de colirio Prednefrin Forte® combinado con la aplicación subconjuntival de Celestone Cronodose®. El aumento en la PIO se evidenció a partir de la segunda semana de inducción y se mantuvo elevado hasta el final del estudio (ver figura 57).

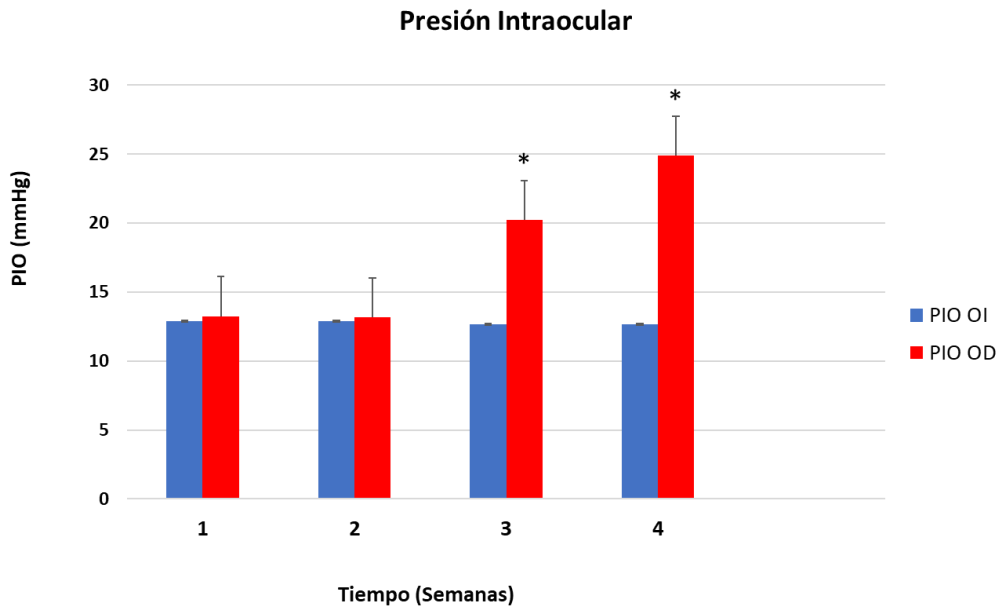


Figura 57: Valores de PIO, medidas con el Tono-Pen Avian® en los ojos de los animales. Inducción de hipertensión ocular, incremento significativo a partir de la 2 semana. Valor significativo: $P \leq 0.05$.

5. Se utilizó el tonómetro Tono-Pen Avian®, previamente calibrado, para medir la PIO en este modelo experimental. Se observó que este dispositivo es fácil de usar, ofrece alta precisión y sus resultados son fácilmente interpretables para la especie estudiada. Todas las mediciones fueron realizadas por una persona con amplia experiencia en el manejo de este aparato.

6. Como se ha descrito en la literatura, la PIO está sujeta a variaciones circadianas, por lo que todas las medidas fueron tomadas a la misma hora del día (8:00-9:00 / 20:00-21:00). No se observó diferencia significativa en los ojos controles con respecto al período del día (P>0.05), presentando un promedio de PIO de 12,88 ±2,3 mmHg. En cuanto al ojo experimental, la PIO diurna fue ligeramente más alta (18,26 ±2,4 mmHg) en comparación con la PIO nocturna (17,50 ±2,1 mmHg) (ver figura 58). Sin embargo, esta diferencia no fue significativa (P>0.05). Este hallazgo coincide con lo observado en humanos, donde se ha encontrado que la producción de humor acuoso es significativamente más baja por la noche, lo cual puede atribuirse a los menores niveles de catecolaminas circulantes durante ese período. Sin embargo, este resultado deberá ser corroborado en la fase experimental.

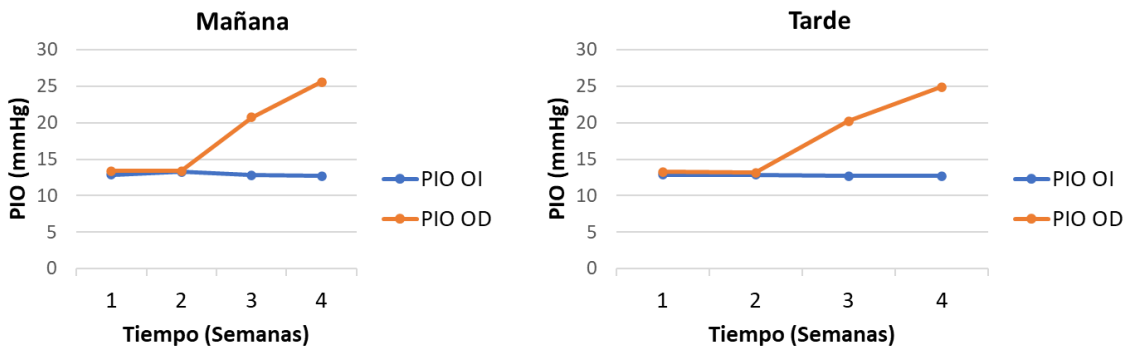


Figura 58: Gráfico demostrando el aumento de la PIO en el grupo experimental en un periodo de 4 semanas. Sin embargo, no se observó diferencia significativa con relación al periodo del día (*P*>0.05).

7. Se registraron 5 lecturas en cada ojo para una mayor precisión en la medida de la PIO. Sin embargo, algunos autores recomiendan realizar 15 lecturas en cada ojo para garantizar la precisión de las mediciones (370). Se optó por mantener este número de registros en la fase experimental, ya que hay informes que sugieren que el contacto repetido de la punta del aparato con la córnea puede afectar los valores de la PIO, y que las mediciones sucesivas pueden favorecer la eliminación del humor acuoso a través de las vías de drenaje, causando adelgazamiento de la córnea y alterando los resultados (452).

Durante la anestesia de dos conejos, se observó que los animales continuaron mostrando movimientos masticatorios involuntarios. Este hallazgo es relevante y será considerado en la fase experimental, donde se llevará a cabo la toma de muestras de humor acuoso, la aplicación intravítrea de WJ-MSCs y el estudio de flash-VEP. Por lo tanto, se planea ajustar la dosis de

anestesia inyectable según sea necesario para cada animal, teniendo en cuenta las variaciones en el índice corporal.

- ***Resultados Histopatológicos***

1. Durante el examen histopatológico de los ojos para investigar la muerte de células ganglionares de la retina y las alteraciones en el nervio óptico, se observó la presencia de gliosis (ver figura 59) y una leve excavación del nervio óptico en los animales sometidos a 4 semanas del experimento, lo que sugiere un cambio glaucomatoso temprano. La literatura sugiere que la gliosis puede indicar el inicio de la lesión glaucomatosa, posiblemente desencadenando mecanismos compensatorios para mantener la función en el tejido lesionado (453).

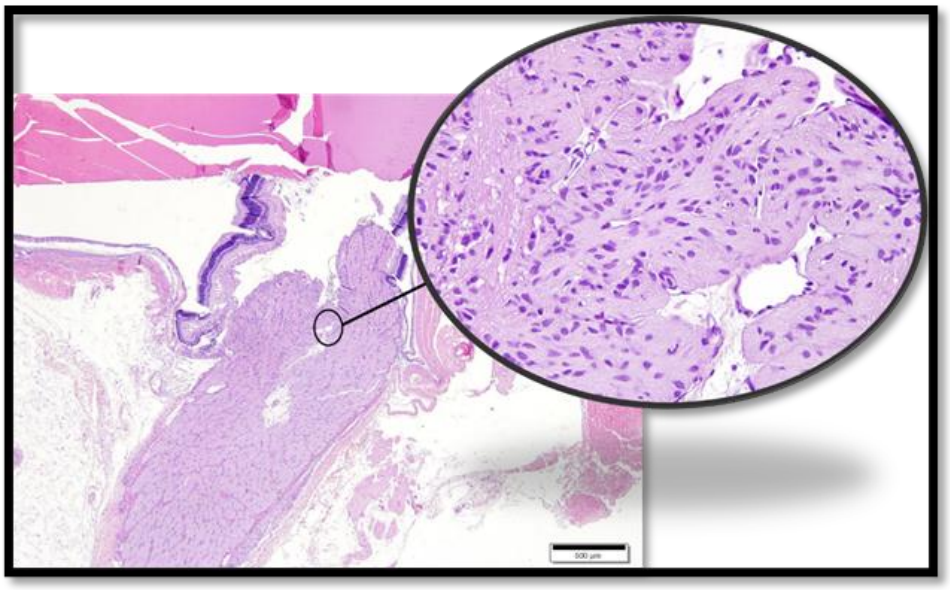


Figura 59: Estudio histopatológico nervio óptico del conejo. Nervio óptico teñido con hematoxilina eosina en un modelo de hipertensión ocular. 50µm nervio óptico evidenciando aumento de células gliales.

2. El estudio histopatológico no reveló cambios en las células ganglionares de la retina (CGRs) (ver figura 60) que sugirieran la presencia de glaucoma. Se considera que, al extender el experimento al período inicialmente previsto de 9 semanas, será posible observar la muerte de las CGRs y la aparición de daños más significativos relacionados con la enfermedad glaucomatosa. Basándonos en este resultado, se decidió modificar el momento de aplicación de las células estromales mesenquimales (originalmente planificado para la semana 2), ya que aún no se observaron alteraciones en las capas de la retina durante el

período de 4 semanas. En el nuevo cronograma propuesto, las células se aplicarán en la semana 7 del estudio, ya que se cree que, en ese momento, además de la gliosis, se podrán observar algunos cambios morfológicos tanto en la retina como en el nervio óptico. Este enfoque está respaldado por un estudio publicado en 2011, en el que se observaron cambios en la retina de conejos a partir de los 4 días posteriores a la aplicación de células madre mesenquimales humanas en el vítreo (280).

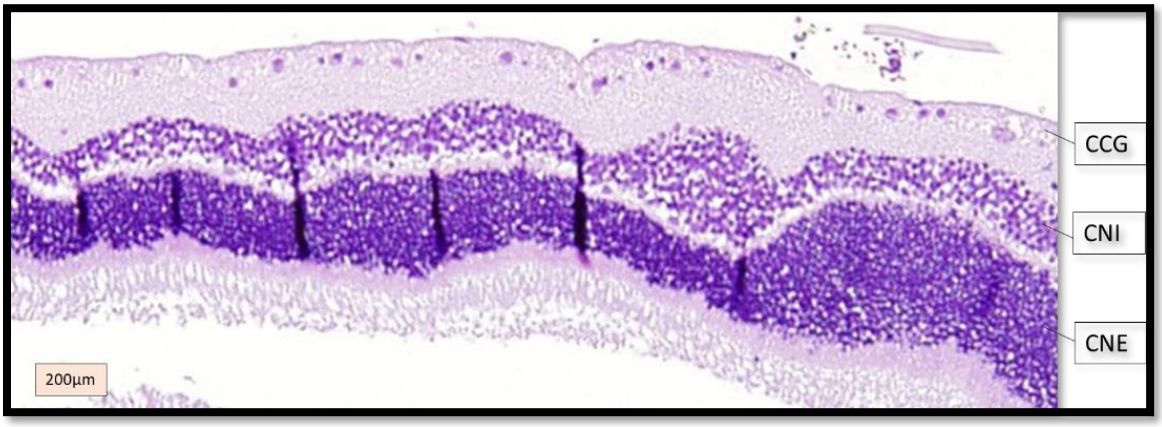


Figura 60: Estudio histopatológico retina del conejo. Observación de las capas de la retina teñidas con hematoxilina eosina en un modelo de hipertensión ocular. **CCGR**: Capa Células Ganglionares; **CNI**: Capa Nuclear Interna y **CNE**: Capa Nuclear Externa. 200µm

3. En cuanto al ángulo de drenaje, el análisis histopatológico no reveló cambios significativos en las estructuras (ver figura 61) de los animales sometidos a hipertensión ocular. Además, se confirmaron similitudes con los hallazgos observados en humanos en relación con el ángulo de drenaje en los conejos. El ángulo de drenaje del conejo incluye las siguientes estructuras anatómicas: el canal de Schlemm (plexo/seno acuoso angular), la malla trabecular, el iris, la cámara anterior, la córnea y la esclera.

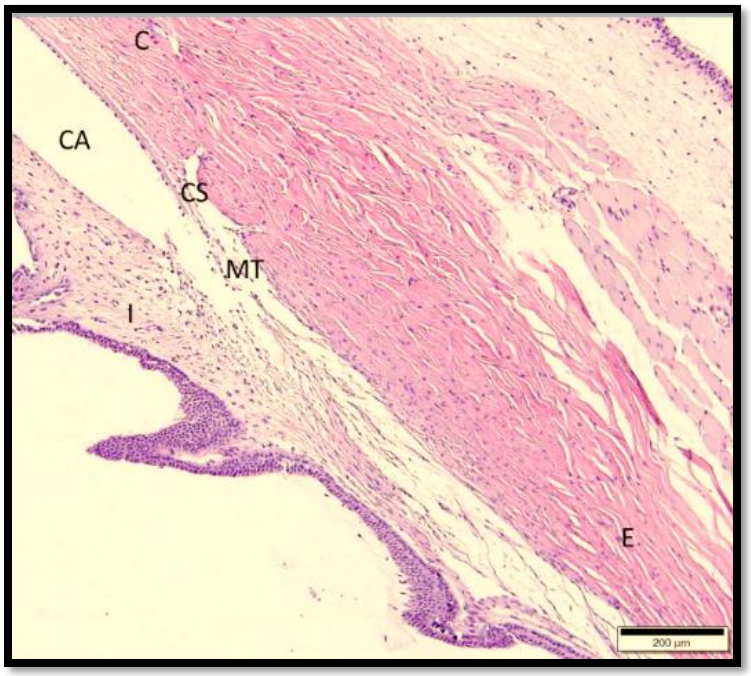


Figura 61: Estudio histopatológico del ángulo de drenaje del conejo. Observación de las estructuras teñidas con hematoxilina eosina en un modelo de hipertensión ocular. **I:** Iris; **CA:** Cámara Anterior; **CS:** Canal Schlemm; **MT**: Malla Trabecular; **C:** Cornea y **E:** Esclera. 200µm

- ***Resultados Respuesta pupilar fotocromática***

1. Durante este estudio, se pudo observar la activación de diversos tipos de células, como los fotorreceptores (conos y bastones), así como la respuesta del pigmento fotosensible presente en las CGRs ante el estímulo luminoso aplicado con diferentes longitudes de onda.
2. En relación con la prueba utilizando luz roja (longitud de onda 630 nm), se observó una constricción pupilar en respuesta a la luz incidente en los animales estudiados (ver figura 62).
3. Respecto a la prueba con luz azul (longitud de onda de 480 nm), se observó una constricción pupilar en respuesta a la luz incidente, lo que indica que no se produjeron alteraciones en las CGRs ni en el nervio óptico (ver figura 62). Esto se debe a que los ojos estudiados no presentaron lesiones en las CGRs, aunque se observó gliosis en el nervio óptico, como se describió en el estudio histopatológico.

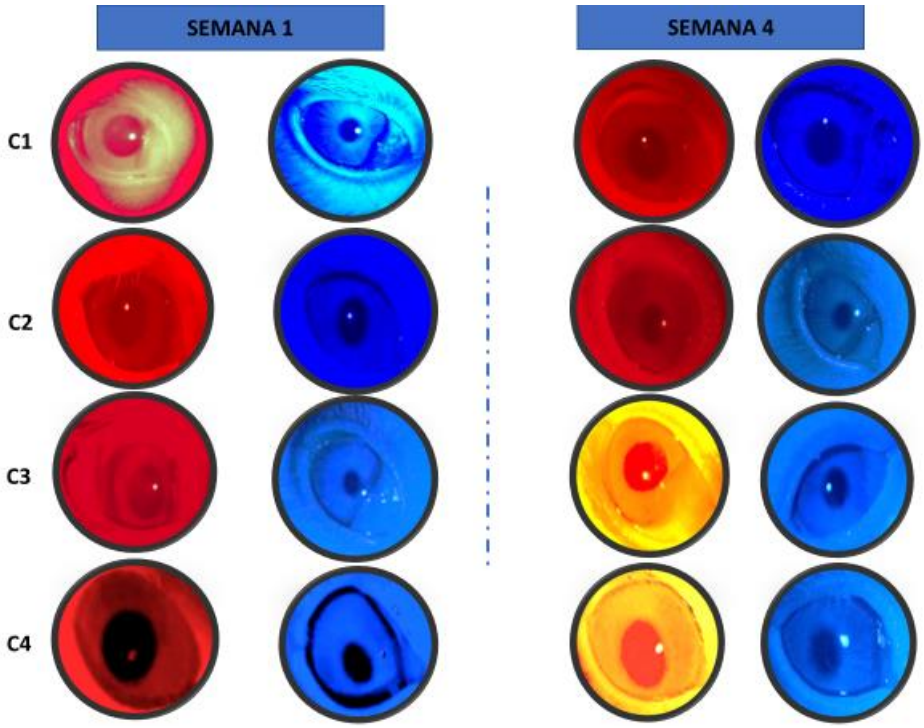


Figura 62: Evaluación Respuesta Pupilar Fotocromática. Prueba realizada en 4 animales del estudio piloto. Presencia de respuesta pupilar al aplicar luz roja y azul en un período de 4 semanas de investigación. Resultados demuestran actividad normal de la retina.

4. Se sospecha que, al llevar a cabo la fase experimental del estudio en el tiempo previsto para la evaluación del reflejo pupilar fotocromático, se podrían observar alteraciones como la ausencia de respuesta a la luz roja y azul durante la estimulación luminosa.
5. Con el propósito de mejorar la validez de los resultados, en la fase experimental se empleará un programa ImageJ app (v.1.53e, Wayne Rasband, USA) para medir la constricción del diámetro pupilar inducida por la luz cromática en los animales estudiados. De este modo, se obtendrán resultados más confiables en cuanto a la respuesta pupilar provocada por el estímulo cromático.

- ***Resultados de la cinética inflamatoria***

Con el fin de abordar la pregunta planteada: *¿Cuáles son los marcadores inflamatorios implicados en el glaucoma?,* se realizó una intensa búsqueda investigativa en diversas bases de datos, respetando el cronograma establecido. Durante esta fase de la investigación, no se impusieron restricciones en cuanto al tipo de estudio o idioma. A partir de estos hallazgos, se

identificaron los marcadores más relevantes relacionados con la respuesta inflamatoria y la inmunidad en el glaucoma: IL-6, IL-8, IL-10, IFN-γ, TNF-α, TGF-β, $TCD3^+$, $TCD3^+/TCD4^+$, $TCD3^+/TCD8^+$ y GFAP. Estos marcadores deberían presentarse en la especie propuesta en este estudio. Esta información fue crucial para la toma de decisiones en la investigación, dado que la disponibilidad limitada de kits de antígenos para esta especie restringió las técnicas de análisis empleadas. Considerando el tamaño de muestra requerido para procesar cada kit, se determinó el lugar óptimo para la toma de muestras: el humor acuoso o el humor vítreo. Entre los marcadores empleados en nuestra investigación se pueden destacar los siguientes:

- **IL-6:** Esta citoquina posee características tanto antiinflamatorias como proinflamatorias. Su liberación se ve inducida por la IL-1 y aumenta en respuesta al TNF-α. Se ha considerado que la IL-6 actúa como un factor neurotrófico, protegiendo a las neuronas contra el daño en diversas enfermedades degenerativas neurales. Sin embargo, también se ha sugerido su participación en el daño de las CGRs, lo que subraya la complejidad de su papel tanto en el daño como en la protección de la retina. Por lo tanto, resulta crucial observar los niveles de concentración de esta citoquina al administrar WJ-MSCs por vía intravítrea.
- **L-8:** Es una citoquina proinflamatoria, sintetizada en diversos tipos celulares como fibroblastos, células endoteliales, monocitos, macrófagos y células dendríticas. Actúa como un potente factor quimiotáctico para los neutrófilos y regula la producción de proteínas de adhesión y la formación de lípidos bioactivos. Se ha sugerido que las células de la malla trabecular podrían ser una fuente local de secreción de IL-8. Por lo tanto, los niveles de IL-8 podrían reflejar el estado de remodelación de la matriz extracelular y la fibrosis en la malla trabecular en los ojos con aumento de la PIO.
- **IL-10**: Esta citoquina se caracteriza por su naturaleza antiinflamatoria, ya que es capaz de inhibir la síntesis de citoquinas proinflamatorias por parte de los linfocitos T y los macrófagos, así como otras funciones inflamatorias de estas células. Niveles bajos de IL-10 podrían estar asociados al desarrollo de GPAA.
- **TNF-α**: Esta citoquina, de naturaleza proinflamatoria, puede causar daño en el nervio óptico y en las CGRs cuando se sobre expresa. Esta sobreexpresión se ha observado en pacientes humanos con glaucoma, lo que sugiere que el TNF-α contribuye a la progresión de esta enfermedad.
- **TGF-β**: Desempeña un papel crucial tanto antiinflamatorio como inmunomodulador en el control del sistema inmune y exhibe diversas actividades en varios tipos de células. Estudios

han demostrado que la concentración de TGF-β aumenta en el humor acuoso y en la malla trabecular al utilizar dexametasona en un modelo de hipertensión ocular en roedores, lo que sugiere que esta citoquina desempeña un papel central en el aumento de la PIO (76). Es crucial examinar si estos mismos cambios en las concentraciones de TGF-β se encuentran en otras especies, como los conejos, lo que podría proporcionar una comprensión más completa de su papel en el glaucoma

- **IFN-γ:** Es una citoquina proinflamatoria cuyos niveles elevados se asocian con el daño en la retina y las CGRs en pacientes con glaucoma.
- **Anti-GFAP**: Este anticuerpo se une a la proteína GFAP, que es la principal proteína de los filamentos intermedios del citoesqueleto de los astrocitos. Normalmente, las células de Müller presentan una baja concentración de estas proteínas, pero su expresión aumenta en condiciones patológicas del sistema nervioso.
- **TCD3$^+$, TCD4$^+$ y TCD8$^+$:** La presencia de linfocitos T en la retina es atípica debido a las barreras que existen para impedir su entrada en este tejido. No obstante, hay estudios que han documentado la presencia de este tipo celular en la retina de ratones.

c) Análisis de la prueba Flash-PEV

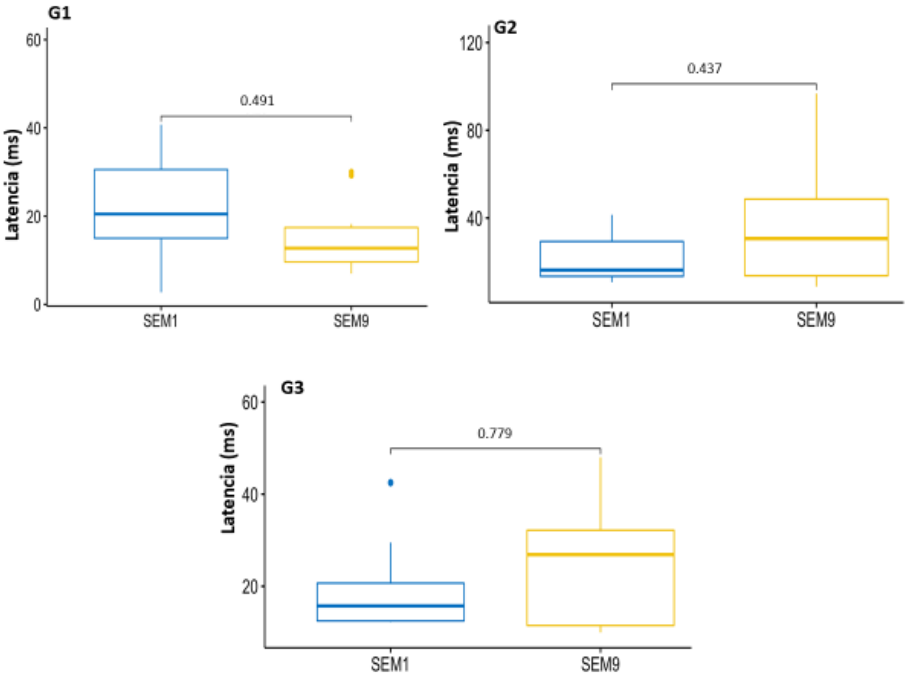


Figura 63: Gráficos BloxPlot demostrando medidas de latencia de onda en los ojos experimentales, a lo largo del experimento. Al evaluar N2 (latencia) entre las semanas 1 y 9, observamos una reducción no significativa en G1. Sin embargo, se encontró un aumento no significativo en G2 y G3. Prueba estadística: ANOVA de Friedman, valores significativos: *P*≤ 0.05. **G1**: HO, **G2**: WJ-MSCs y **G3**: HO + WJ-MSCs.

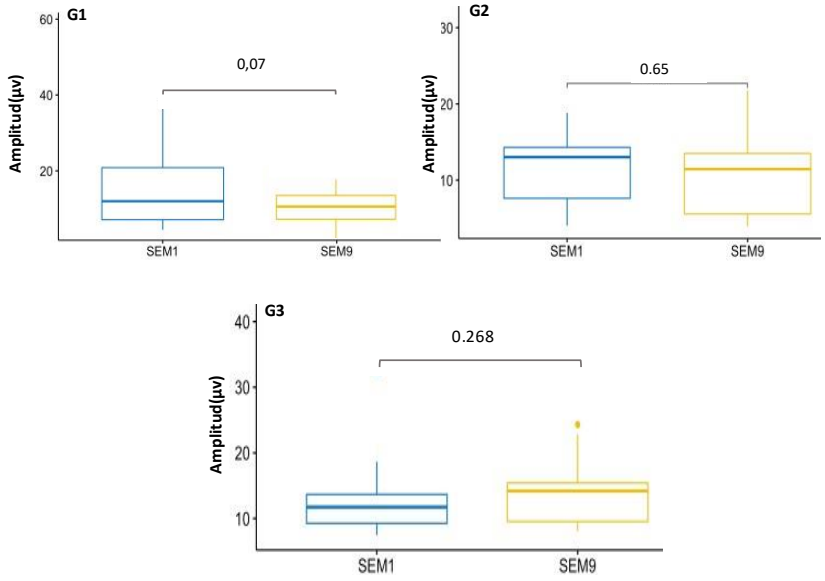


Figura 64: Gráficos BloxPlot demostrando medidas de amplitud de onda en los ojos experimentales, a lo largo del experimento. En P2 (amplitud), se observó una reducción no significativa en G1. Sin embargo, no hubo cambios significativos en G2, pero sí un pequeño aumento en G3. Prueba estadística: ANOVA de Friedman, valores significativos: *P*≤ 0.05. **G1**: HO, **G2**: WJ-MSCs y **G3**: HO + WJ-MSCs.

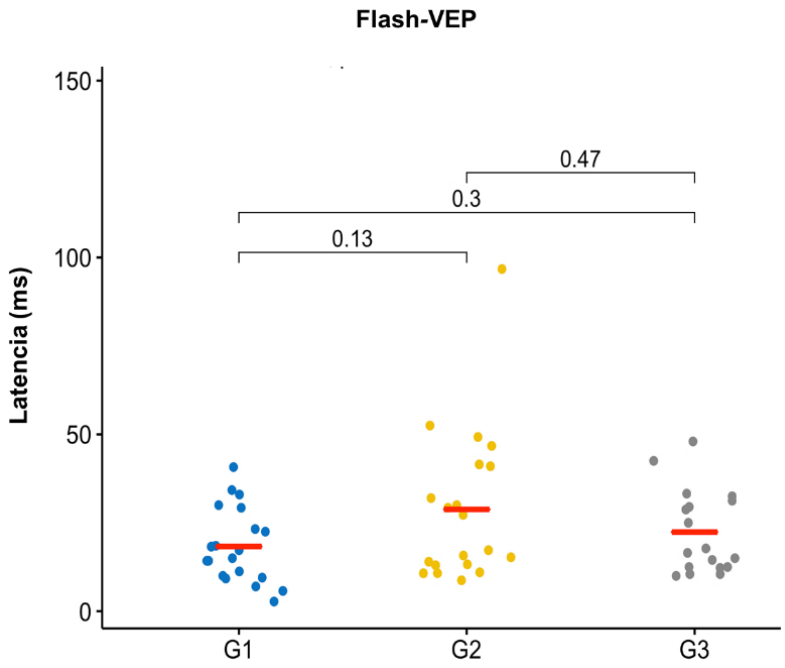


Figura 65: Latencia después de la inducción de hipertensión ocular y trasplante intravítreo de WJ-MSCs. Gráficas muestran diferencia no significativa entre grupos. No obstante, observamos que los grupos que recibieron terapia celular (G2 y G3), presentaron latencias más altas que el grupo sin terapia celular G1, pero no fue estadísticamente significativo. Prueba estadística: Kruskal-Wallis ANOVA, valores significativos: *P*≤0.05. **G1**: HO, **G2**: WJ-MSCs y **G3**: HO + WJ-MSCs.

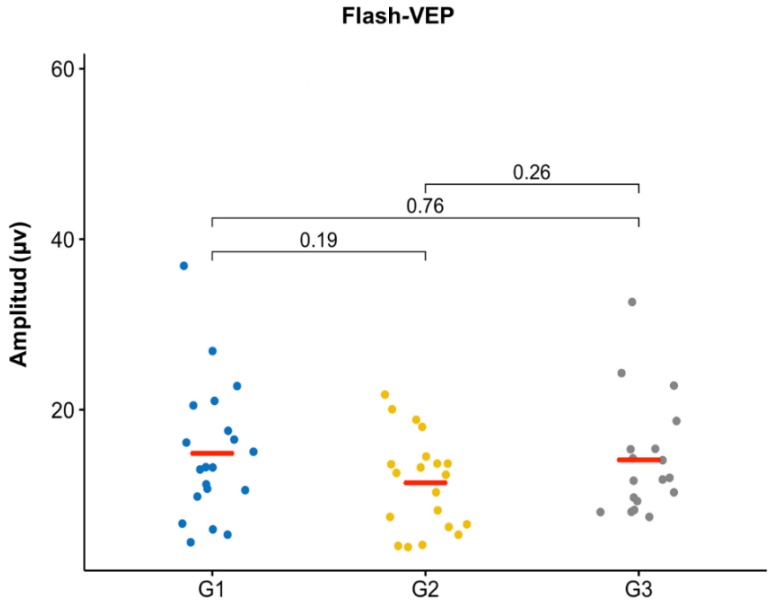


Figura 66: Amplitud de onda después de la inducción de hipertensión ocular y trasplante intravítreo de WJ-MSCs. Gráficas muestran diferencia no significativa entre grupos. Sin embargo, observamos una menor amplitud en G2 y G3 con respecto al G1, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa. Prueba estadística: Kruskal-Wallis ANOVA, valores significativos: *P*≤0.05. **G1**: HO, **G2**: WJ-MSCs y **G3**: HO + WJ-MSCs.

C) Respuesta pupilar fotocromática

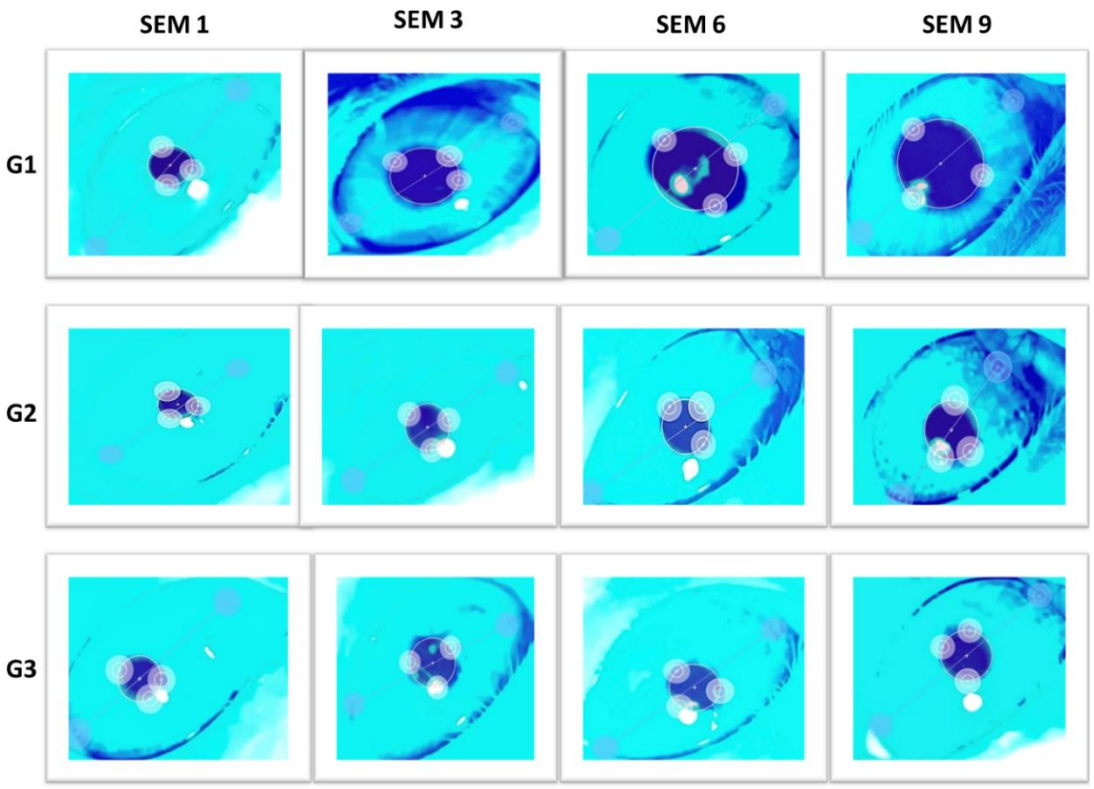


Figura 67: Respuesta pupilar fotocromática: Medidas del diámetro pupilar post estímulo con luz azul observados en el modelo de hipertensión ocular y *post* trasplante intravítreo de WJ-MSCs. Alteraciones en el diámetro pupilar en G1 observadas en el transcurso del estudio**.** G2 y G3: leves cambios en el diámetro pupilar. **G1**: HO, **G2**: WJ-MSCs y **G3**: HO + WJ-MSCs.

Tabla 9: Análisis de correlación de luz azul con amplitud y latencia entre los grupos del estudio.

		Grupo	Amplitud (*P* valor)	Latencia (*P* valor)
Luz Azul	**Semana 1**	G1	0.149 (0.811)	0.044 (0.944)
		G2	0,051 (0.935)	0,572 (0,313)
		G3	0.8 (0,333)	0,718 (0,172)
	Semana 9	G1	0,24 (0.76)	0,752 (0.248)
		G2	0.2 (0.917)	0.6 (0.417)
		G3	0,293 (0.633)	0,402 (0.502)

Análisis de correlación de Pearson o Spearman. Al correlacionar la estimulación de luz azul con la amplitud y la latencia, no se observaron correlaciones estadísticamente significativas. Valores significativos: *P*≤0.05. **G1**: HO, **G2**: WJ-MSCs y **G3**: HO + WJ-MSCs.

D) Inmunohistoquímica

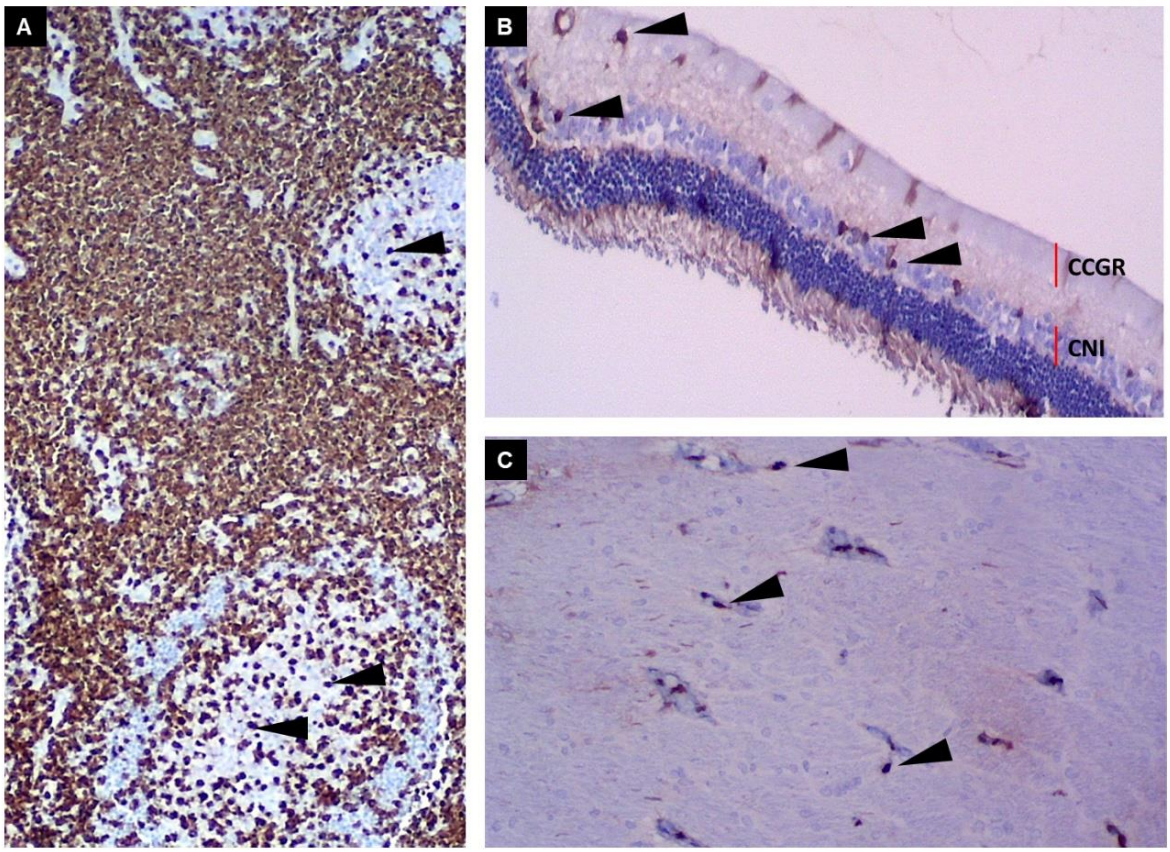


Figura 68: Inmunohistoquímica: Inmunomarcación positiva para células TCD3⁺. A) Flecha: Control positivo para células TCD3⁺ en bazo; **B)** Flecha: Inmunomarcación positiva para células TCD3⁺ en la CCGRs y la capa nuclear interna (CNI) de la retina de conejos y **C)** Inmunomarcación de células TCD3⁺ positivas en nervio óptico.

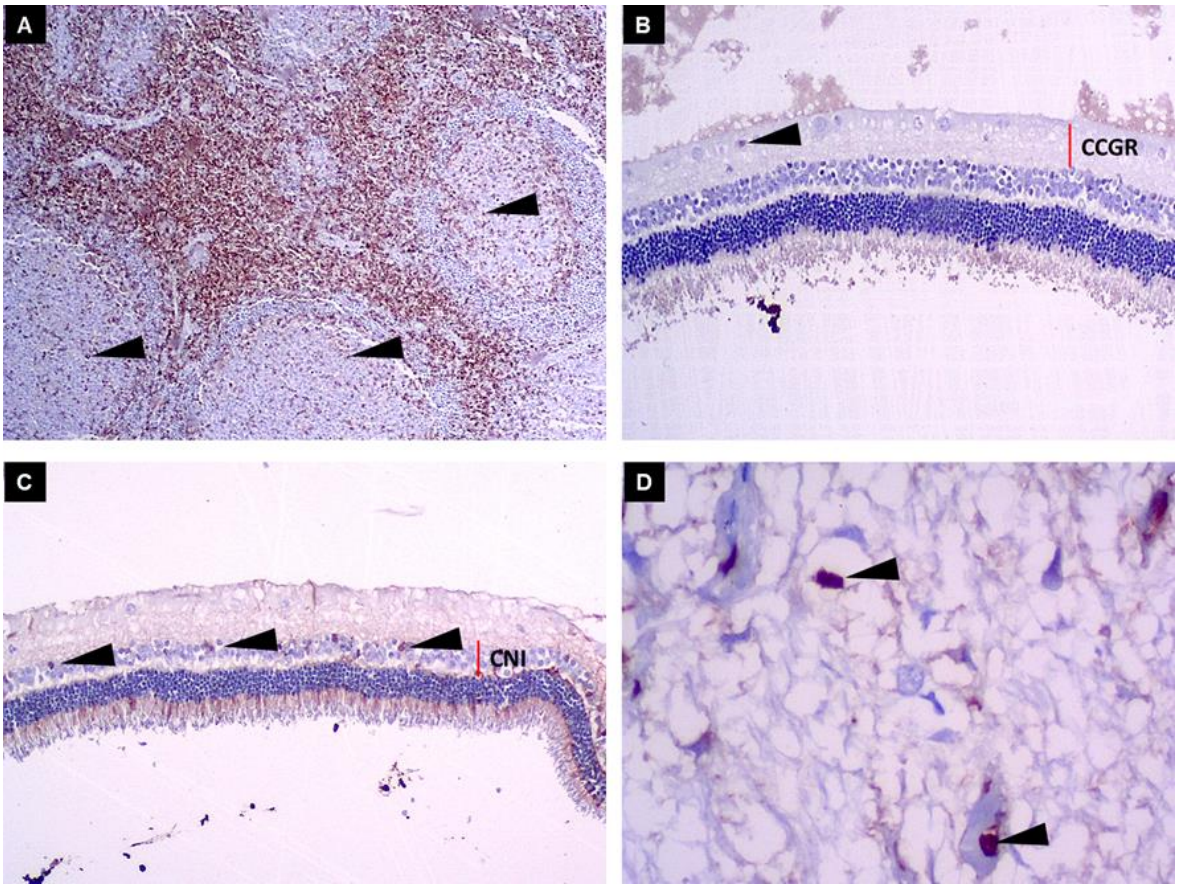


Figura 69: Inmunohistoquímica: Inmunomarcación positiva para células TCD3$^+$/TCD4$^+$. A) Flecha: Control positivo para células TCD4$^+$ en bazo; **B)** Flecha: Inmunomarcación positiva para células TCD4$^+$ en la CCGRs; **C)** Flecha: Inmunomarcación positiva para células TCD4$^+$ en la capa nuclear interna (CNI) de la retina de conejos y **D)** Inmunomarcación de células TCD4$^+$ positivas en nervio óptico.

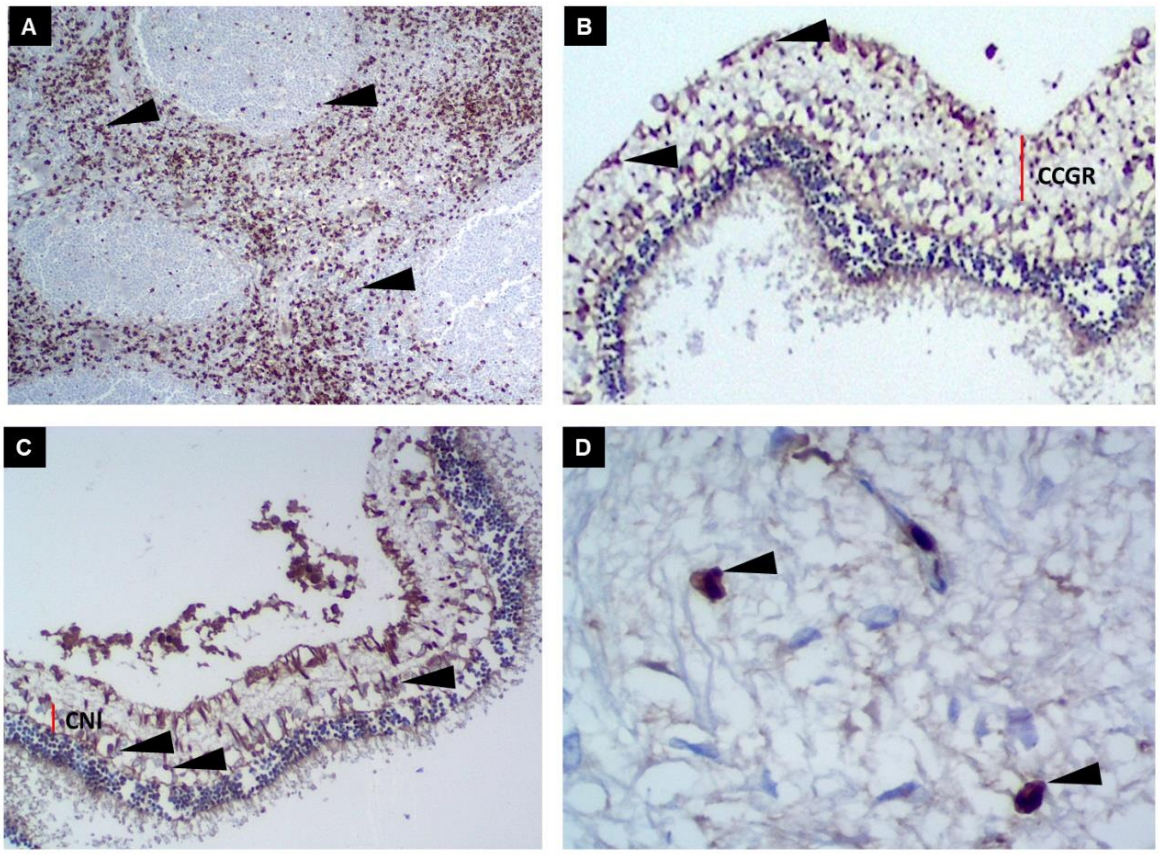


Figura 70: Inmunohistoquímica: Inmunomarcación positiva para células TCD3$^+$/TCD8$^+$. A) Flecha: Control positivo para células TCD8$^+$ en bazo; **B)** Flecha: Inmunomarcación positiva para células TCD8$^+$ en la CCGRs; **C)** Flecha: Inmunomarcación positiva para células TCD8$^+$ en la capa nuclear interna (CNI) de la retina de conejos y **D)** Inmunomarcación de células TCD8$^+$ positivas en nervio óptico.

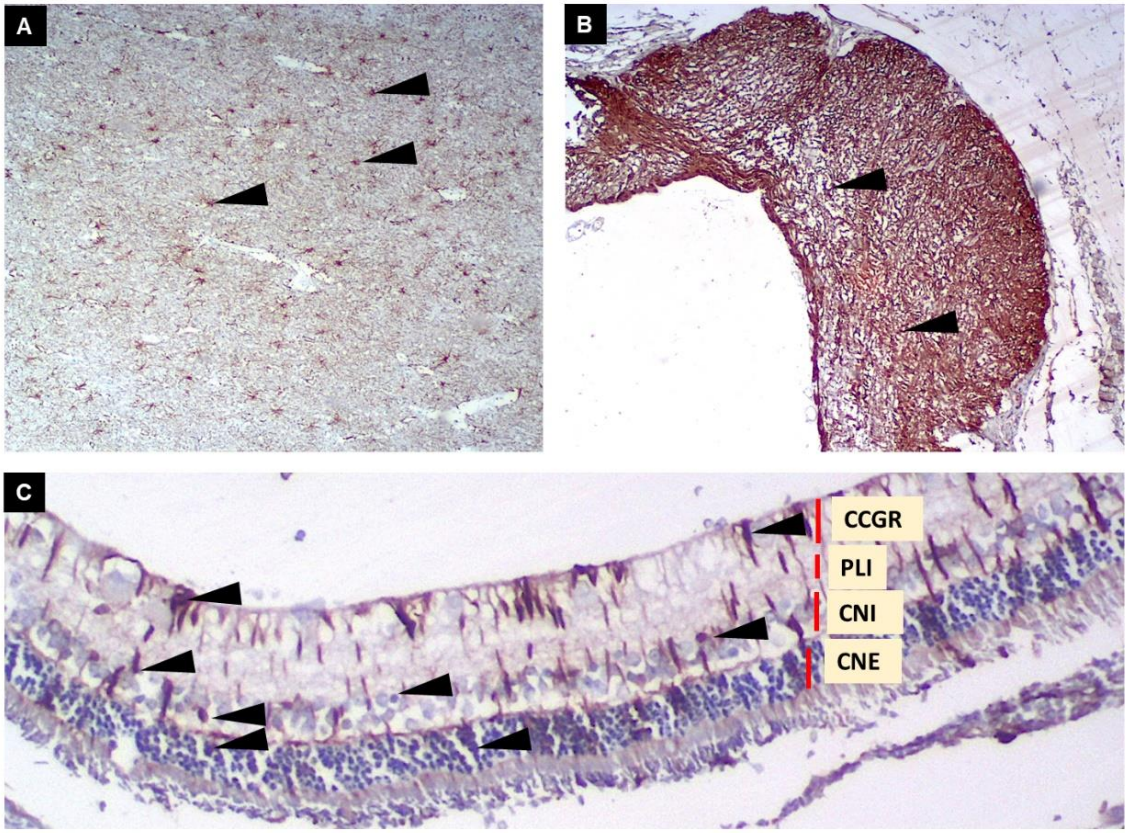


Figura 71: Inmunohistoquímica: Inmunomarcación positiva para expresión de GFAP. A) Flecha: Control positivo para expresión GFAP en bazo; **B)** Inmunomarcación positiva para expresión GFAP en nervio óptico y **C)** Flecha: Inmunomarcación positiva para expresión GFAP en la capa de células ganglionares de la retina (CCGR); plexiforme interna (PLI); capa nuclear interna (CNI) y capa nuclear externa (CNE).